



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Cyndel BERGER

Le 9 décembre 2019

**Traitement phytosanitaire des arbres par micro-injection :
résilience de la blessure, transfert des molécules et efficacité**

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et
Bioingenieries**

Spécialité : **Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition**

Unité de recherche :
TOXALIM - Laboratoire de Toxicologie Alimentaire

Thèse dirigée par
François LAURENT et Adeline RENIER

Jury

Mme Marie-Noëlle BRISSET, Rapporteure
M. Patrice REY, Rapporteur
M. Stéphane HERBETTE, Examineur
Mme Jacqueline GRIMA-PETTENATI, Examinatrice
M. François LAURENT, Directeur de thèse
Mme Adeline RENIER, Co-directrice de thèse

Remerciements

3 années de thèse... Certes il y a eu de longues heures de travail qui m'ont parfois semblées interminables mais pas que ! Ce fut aussi une expérience scientifique et professionnelle épanouissante mais surtout une très belle aventure humaine qui est finalement passée bien trop vite.

Avant de citer toutes les personnes, qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail de thèse, je tenais à remercier BPI France (FUI PREAMISSE) et le département SPE de l'INRA pour avoir financé ces trois années de recherche ainsi que la DARESE de l'INRA qui a financé mon séjour en Italie. Je remercie également l'Ecole doctorale SEVAB pour son accompagnement et Isabelle Oswald de m'avoir accueillie dans son unité.

Je remercie Daniel Zalko et Fabien Jourdan qui m'ont accueillie au sein de leur équipe et pour leurs conseils avisés qui ont ainsi contribué à la réussite de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à Marie-Noelle Brisset et Patrice Rey, qui m'ont fait l'honneur d'être mes rapporteurs ainsi qu'à Jacqueline Grima-Pettenati et Stéphane Herbette qui ont accepté d'être mes examinateurs. Je souhaite aussi remercier les membres de mon comité de thèse, Hervé Cochard et Thierry Lamaze, pour leur expertise scientifique et leurs précieux conseils.

Je remercie aussi tous les membres du projet PREAMISSE pour les échanges enrichissants et en particulier Lauragri Service (porteurs du projet) et le CETEV. Je remercie Florence Verpont et Audrey Petit pour nous avoir fourni les arbres et les vignes. Merci aussi à Jean Pierre Remy et Wilfried Remus-Borel pour les solutions injectables.

Mon plus grand merci va sans hésitations à François Laurent, mon directeur de thèse, avec qui j'ai partagé toutes les épreuves mais aussi les meilleurs moments. Merci pour la confiance que tu m'as accordée. Mes idées et mes questionnements ont toujours trouvé une oreille attentive et bienveillante et grâce à tes conseils avisés, je suis aujourd'hui fière de ces trois années. Merci pour les longues conversations et débats scientifiques qui ont fait évoluer le sujet au fil du temps, et pour les nombreuses heures de corrections que tu as passé sur ce manuscrit. Bien sûr, je n'ai pas besoin de préciser aussi les bons moments autour d'une bière, qui j'espère seront toujours d'actualité.

Un grand merci aussi à Adeline Renier, ma co-directrice de thèse. Je suis ravie des moments que nous avons partagés car, outre ton appui scientifique, tu m'as beaucoup

soutenue et conseillée, en particulier dans l'élaboration de la thèse et la dernière ligne droite.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement la « team Jardiland ». Non ce n'était pas que du jardinage mais aussi du travail scientifique acharné ! Merci Louisa pour tout l'investissement dont tu as fait preuve pour générer ces résultats, pour ton soutien dans les moments difficiles de fin de projet et ta bonne humeur constante. Merci Kevin pour ton implication dans le travail et encore désolée pour les risques que j'ai fait courir à tes doigts avec les échantillons de microscopie, je n'aurais sûrement pas survécu seule ! Travailler avec toi était un réel plaisir. Merci Ozgur pour l'aide dans les manips et surtout pour les moments partagés le week-end au labo. J'espère venir te voir un jour en Turquie.

Merci à tous ceux qui ont enfilé les bottes pour le champ même s'il ne s'agissait pas de leur domaine d'expertise. Je sais bien que la promesse du restaurant le midi a été ma meilleure force de persuasion (Elodie, Sandrine, Louisa, Florence, Kevin et François). Je remercie également Monsieur Avelle qui nous a mis à disposition des arbres de son verger.

Merci à Lucio Montecchio qui m'a accueilli avec générosité dans son laboratoire en Italie. Je remercie Genny Fanchin pour son aide précieuse dans les manips et Elisa Dal Maso pour les échanges scientifiques. Merci aussi à tous mes autres collègues italiens pour leur accueil chaleureux et les échanges autour d'un spritz (Severino, Marco, Max, Stefan, Luca, David, Cristina...). Grazie mille !

Je tiens aussi à remercier les gestionnaires d'unité, Marie-Hélène Piquereau et Sarah Calcagno pour tous les aspects administratifs, en particulier pour mon départ en Italie.

Je remercie la plateforme Axiom pour l'accès au matériel de spectrométrie de masse. Merci à Marie Tremblay et Jean-François Martin pour leur précieuse aide avec les statistiques ainsi qu'à Sylvie Chevolleau pour la spectrométrie de masse. Merci également au reste de leur équipe pour les moments conviviaux partagés (Roselyne, Cécile, Loïc, Alyssa, ...).

Je voudrais aussi remercier le personnel de la plateforme de microscopie de la FR-AIB et en particulier Alain Jauneau pour ses précieux conseils.

Je remercie également les membres de l'école doctorale SEVAB pour leur accompagnement et en particulier Dominique Pantalacci pour son aide en toutes circonstances.

Merci à Elodie sans qui certains graphiques n'auraient pas existés et surtout ta bonne humeur quotidienne du début à la fin de la thèse.

Merci Nicolas pour tes corrections en anglais ainsi que pour ta bienveillance, tu as su me réconforter dans les moments de doutes.

Merci à Clément qui m'a aidé pour les points « informatiques » qui me sont souvent étrangers, mais aussi un grand merci pour ta gentillesse, ton humour (moqueur) et ton soutien sans faille.

Merci à mes collègues de bureau qui ont supporté l'envahissement dont j'ai pu faire preuve au quotidien, Joran et Thomas.

Merci à Sandrine Bruel, qui je confirme, est une maman pour cette équipe.

Je tiens à remercier plus globalement toutes les personnes de l'équipe qui ont animé mes journées de travail et même plus : Marc (pour le programme musical), Anne, Florence, Laure, ainsi que tout le groupe des « geeks », Nathalie, Florence, Maxime, Pablo, et ceux déjà cités avant. Je vous remercie tous pour les bons moments partagés et pour la bonne ambiance générale.

Je souhaite remercier aussi mes collègues de l'animation scientifique et de ToxAvenir, des personnes engagées pour le collectif et passionnés de science, avec qui j'ai partagé des moments enrichissants.

Enfin, j'adresse tous mes remerciements à mes proches. Je remercie ma famille qui a toujours cru en moi, mes parents qui m'ont permis de suivre mes passions et particulièrement ma maman qui m'a poussée vers la réussite. Merci à tous les copains de pêche cool pour leurs nombreux encouragements, à mes copines du cheval, mes copains du vrai sud et toutes les personnes qui participent à mon bonheur. Un merci spécial à Quentin, qui a vécu à mes côtés tous les moments de cette thèse. Merci pour ton soutien inépuisable et inconditionnel.

Avant-propos

Cette thèse a été financée sur une durée de 3 ans par BPI France et par le département SPE de l'INRA. Ce travail s'inscrit plus largement dans le cadre du projet FUI PREAMISSE (PRotEction des Arbres par Micro-Injection SécuriséE). Le but de ce projet était de garantir une technique de micro-injection efficace tout en limitant les dommages sur l'arbre traité et les conséquences néfastes pour l'homme et l'environnement. Afin d'y parvenir, les travaux ont été réalisés sur quatre espèces ligneuses modèles, à savoir le pin, le pommier, le châtaignier et la vigne. Ce projet était porté par Lauragri Service, en charge de coordonner les différents lots du projet. Le projet PREAMISSE était piloté par un consortium de 7 partenaires : l'entreprise Premetec avait pour mission la conception de l'instrumentation de micro-injection, tâche à laquelle le Cetev (Centre d'Expertise en Techniques Environnementales et Végétales) a aussi participé. La formulation de produits phytosanitaires spécifiques à la micro-injection a été réalisée par Belchim Crop Protection. Une autre partie du projet concernait les essais de démonstration de la méthode de micro-injection, exécutés par Lauragri Service et le Cetev, ainsi que les essais d'efficacité au champ. Des problématiques liées aux insectes et aux champignons ont été ciblées dans les essais d'efficacité. L'IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin) s'occupait des tests sur la vigne, le CTIFL (Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes) des tests sur pommier et châtaignier, le Cetev des essais en zones non agricoles et l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) de l'analyse des résidus dans les échantillons. Enfin, l'INRA avait aussi en charge d'étudier les blessures causées par l'injection, le transfert systémique des substances actives et les effets non intentionnels de la méthode. Cette partie faisait l'objet de cette thèse.

Au cours de ce projet, la DARESE (Direction de l'Action Régionale, de l'Enseignement Supérieur et de l'Europe) de l'INRA m'a octroyé un financement permettant ainsi un séjour de trois mois dans le laboratoire du département TESAF (Land, Environnement, Agriculture et Forestry) de l'Université de Padoue en Italie. Ce séjour a eu lieu dans le cadre du parcours EIR-A (Ecole International de Recherche d'Agreenium).

Ce manuscrit reprend l'ensemble des travaux réalisés au cours de ces trois années de thèse. Trois articles scientifiques ont été produits et sont insérés, il y a donc des parties écrites en anglais, néanmoins, dans un souci de clarté, tous les articles sont introduits par une synthèse en français.

Communications scientifiques

Articles

Berger C. and Laurent F., 2019. Trunk injection of plant protection products to protect trees from pests and diseases. *Crop Protection* 124. (Accepté le 28 mai 2019).

Berger C., Jauneau A., Laurent F., 2019. Wound resilience of trunk injection in apple trees as determined by macroscopic and microscopic observations. (Soumis dans *Plant Pathology*).

Berger C., Mediouni L., Chevolleau S., Bouville A., Martin J.F., Laurent F., 2019. Pharmacokinetic analysis of spatio-temporal dynamics in apple tree leaves of trunk injected imidacloprid, pyrimethanil and difenoconazole. (En preparation pour soumission dans *Pest Management Science* fin octobre 2019).

Communications orales

Berger C., Renier A., Mediouni L., Laurent F., 2018. Transfert systémique des produits phytosanitaires dans les arbres après injection dans le tronc. 48^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides, 30 mai au 1^{er} juin 2018, Limoges, France. (Résumé annexe 1). Prix de la meilleure présentation orale du 31 mai.

Posters

Berger C., Renier A., Mediouni L., Laurent F., 2018. Systemic transfer of Plant Protection Products in trees after trunk-injection. 10^{es} Journée des doctorants SPE, 27 au 29 juin 2018, Nice, France. (Annexe 2). 3^{ème} prix du meilleur poster.

Berger C., Renier A., Mediouni L., Laurent F., 2019. Spatiotemporal dynamics of trunk injected imidacloprid, pyrimethanil and difenoconazole in apple trees. 14th International IUPAC Congress on Crop Protection, 19 au 24 mai 2019, Ghent, Belgique. (Annexe 2). Prix du meilleur poster dans le thème « Application technology and formulation »

Liste des abréviations

Abréviations françaises

ASL	Assise subéro-ligneuse
CETEV	Centre d'Expertise en Techniques Environnementales et Végétales
CO	Composé Organique
CTIFL	Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes
DARESE	Direction de l'Action Régionale, de l'Enseignement Supérieur et de l'Europe
DL	Dose Létale
EIR-A	Ecole International de Recherche d'Agreenium
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IFT	Indice de Fréquence de Traitement
IFV	Institut Français de la Vigne et du Vin
K_F	Constante d'adsorption de Freundlich
K_{ow}	Coefficient de partage octanol/eau
LMR	Limite Maximale de Résidus
nAg	nanoparticules d'Argent
n_F	Coeficient de puissance
ppm	Partie par million (e.g. mg/kg)
PPP	Produit phytopharmaceutique
rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
TA	Tensio-actif

Abréviations anglaises

<i>ai</i>	Active ingredient
dbh	Diameter at breast height
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance
HPLC	High performance liquid chromatography
MS/MS	Tandem mass spectrometry
PB	Primary branch
PB-PK	Physiologically based pharmacokinetic

PPP	Plant Protection Products
PDA	Potato Dextrose Agar
N.A.	Numerical Aperture
LP	Low Pressure
DW	Discolored Wood
WW	Woundwood
RCF	Root Concentration Factor
SP	Sapwood
SAR	Systemic Acquired Resistance
TCSF	Transpiration Stream Concentration Factor

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction	1
1. La lutte contre les maladies et les ravageurs chez les arbres	2
1.1 Les méthodes de lutte antiparasitaire	3
1.2 Méthodes d'application des produits de protection des plantes sur les arbres	5
1.3 Vers une réduction de l'usage des produits phytosanitaires	6
2. Article 1 : L'injection dans le tronc des arbres de produits phytopharmaceutiques pour lutter contre les bioagresseurs	8
3. Système vasculaire chez les espèces ligneuses	37
3.1 Structure générale	37
3.2 Formation des tissus vasculaires	39
3.3 Le xylème : structure et fonction	41
4. Fonctionnement hydraulique	43
5. Transfert des produits phytosanitaires dans les plantes	44
6. Petit précis de pharmacocinétique	47
6.1 Etude pharmacocinétique	49
6.2 L'analyse pharmacocinétique	51
6.3 Modèle Pharmacocinétique	53
6.4 La phyto-pharmacologie	55
7. Objectifs de la thèse et questions de recherche	56
Chapitre 2 : Impact de l'injection sur la santé de l'arbre et résilience de la blessure d'injection	61
1. Introduction	62
2. Dispositif expérimental	64
3. Article 2 : Résilience de la blessure d'injection chez le pommier	66
4. Résilience de la blessure d'injection chez la vigne	86
4.1 Matériels et méthodes	86
4.2 Résultats	87
4.3 Discussion et conclusions	93
5. Conclusions du chapitre	95
Chapitre 3 : Distribution des substances actives dans le houppier et persistance du traitement	99

1. Introduction	100
2. Article 3 : Analyse pharmacocinétique de la dynamique spatio-temporelle dans les feuilles de pommier de l'imidaclopride, du pyriméthanol et du difénocanazole injectés dans le tronc.....	103
3. Essai complémentaire : délai de transfert du difénocanazole	124
3.1 Introduction.....	124
3.2 Matériel végétal	124
3.3 Résultats et discussion	125
4. Conclusions du chapitre	126
Chapitre 4 : Trouver les paramètres qui contrôlent la répartition des substances actives vers le feuillage	129
1. Introduction	130
2. Répartition de l'injectât.....	131
2.1 Matériels et méthodes	132
2.2 Résultats.....	132
2.3 Discussion.....	139
3. Taux de transfert des molécules dans les feuilles et adsorption.....	142
3.1 Matériels et méthodes	144
3.2 Résultats et discussion	151
4. Etude de l'impact de la viscosité sur le flux de substances actives.....	166
4.1 Matériels et méthodes	167
4.2 Résultats et discussion	168
5. Conclusions	171
Chapitre 5 : Etude <i>in vitro</i> de l'efficacité de différentes substances actives antifongiques contre des champignons pathogènes des arbres	175
1. Introduction	176
2. Matériels et méthodes	178
2.1 Substances actives.....	179
2.2 Matériel fongique.....	180
2.3 Tests d'efficacité <i>in vitro</i>	181
2.4 Analyses statistiques	181
3. Résultats	182
4. Discussion	185
Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives	189

1. Synthèse et conclusions.....	191
1.1 Impact de la méthode de micro-injection sur la santé de l'arbre	191
1.2 Distribution spatio-temporelle des produits phytosanitaires et durabilité du traitement	193
1.3 Facteurs contrôlant le transfert des substances actives dans les arbres	194
1.4 Efficacité <i>in vitro</i> de substances actives en vue de leur utilisation par injection	196
2. Limites et difficultés rencontrées	196
3. Discussion générale.....	197
3.1 Impact de la méthode de micro-injection	197
3.2 Vers une application de la méthode	199
4. Perspectives générales.....	204
4.1 Tester différents facteurs qui influencent la réaction de l'arbre à la blessure	204
4.2 Quantifier la rétention des molécules au point d'injection	205
4.3 Optimiser le transfert et évaluer la persistance du traitement.....	206
4.4 Evaluation du risque pour l'environnement.....	207
Bibliographie.....	210
Annexes.....	222

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Types de dérive dans l'environnement liées à la pulvérisation (d'après Wise et al., 2014).	5
Figure 2 : Indicateur de fréquence de traitement (IFT) moyen selon les espèces en 2015.	7
Figure 3 : Structure d'un tronc d'arbre montrant les couches des différents tissus constitutifs. Le xylème est représenté en beige, le phloème en orange et le cambium en vert.	37
Figure 4 : Vue globale des mécanismes de transport de la sève brute en bleu (dans le xylème) et de la sève élaborée en rouge (dans le phloème) (Stroock <i>et al.</i> , 2013).	38
Figure 5 : Formation du xylème et du phloème à partir des cellules cambiales (Ployet, 2017) adaptée de (Schuetz, Smith and Ellis, 2013).	40
Figure 6 : Structure du xylème des angiospermes et des conifères (Choat, Cobb and Jansen, 2008).	42
Figure 7 : Evolution du RCF (●) et du TSCF (■) en fonction de la lipophilie des composés organiques neutres (Delrot and Bonnemain, 1991).	45
Figure 8 : Relation entre la pharmacodynamie d'un principe actif ou d'une substance active et sa pharmacocinétique. Relation entre la pharmacodynamie d'un principe actif ou d'une substance active et sa pharmacocinétique.	48
Figure 9 : Pharmacocinétiques plasmatiques chez l'animal d'un même principe actif (p.a.), mais sous deux formes galéniques différentes p.a.1 et p.a.2, après administration extra-vasculaire d'une même dose, montrant l'intérêt des études pharmacocinétiques. Leurs cinétiques diffèrent essentiellement par un processus d'absorption plus rapide pour p.a.1. ($t_{max\ pa1} < t_{max\ pa2}$) mais une C_{max} plus faible pour p.a.2. malgré une aire sous la courbe (AUC) plus grande. De ce fait, les conséquences pharmacologiques seront différentes.	49
Figure 10 : Modèle mono-compartimental après administration orale d'un médicament sous forme d'un bolus.	54
Figure 11 : Représentation schématique des différents objectifs en lien avec les étapes survenant après l'injection.	57
Figure 12 : Dispositif expérimental utilisé pour étudier la résilience de la blessure d'injection.	64
Figure 13 : Photographies de sites d'injection 7 mois après injection (A) point d'injection normal (B) port avec une fissure, L= Longueur de la fissure. Barres d'échelle=5mm.	88
Figure 14 : Observations macroscopiques de coupes transversales de sites d'injection chez la vigne 19 mois après injection. (A) Coupe en lumière visible montrant la structure d'une blessure d'injection. Cette image montre la présence d'un morceau d'écorce adhérent au trou (triangle) et le bois de plaie (WW) qui s'est formé. Le bois présent dans l'axe de l'injection est coloré (DW). (B) Observation en fluorescence d'un agrandissement	

de la zone impactée par l'injection. Une assise subéro-ligneuse (flèche noire) apparaît autour du bois de plaie. (C) Zoom de la limite entre la zone de bois coloré (DW) et l'aubier normal (SP). Des thylls bouchent les vaisseaux à l'interface (flèches blanches). (D) Des thylls à la limite de la zone colorée (flèches blanches). Barre d'échelle : A=1 mm; B=0,5 mm ; C,D =0,2 mm. 89

Figure 15 : Observations macroscopiques en fluorescence de coupes transversales de sites d'injection chez la vigne 19 mois après injection. (A) Cette image montre un morceau d'écorce adhérant au trou (triangle). La perforation est visible sur la partie gauche (B) Zoom de la zone de perforation. Un morceau d'écorce est inclus dans le bois de plaie (WW). Une assise subéro-ligneuse, qui était déjà présente au moment de l'injection, est visible à la surface de cette écorce. Une ASL (flèche noire) plus épaisse s'est aussi mise en place entre le morceau d'écorce et le bois de plaie. L'ASL entre le tissu phloémien et le périderme est également épaissie (flèche noire). Barre d'échelle : A=1 mm; B=0,2mm. 90

Figure 16 : Observation en fluorescence d'un point d'injection 7 mois après injection. (A) Une assise subéro-ligneuse (flèche noire) apparaît autour du bois de plaie (WW). Dans l'axe de la perforation l'aubier est coloré (DW). (B) Agrandissement de la perforation. Barre d'échelle : A= 1 mm ; B= 0,3 mm. 91

Figure 17 : Observations macroscopiques en fluorescence de coupes transversales de sites d'injection chez la vigne 19 mois après injection. (A) Point d'injection dont le bois de plaie n'a pas encore retrouvé sa continuité. Une assise subéro-ligneuse (flèche noire) ferme le trou. Du rhytidome d'écorce est présent dans le trou (triangle). (B) Point d'injection avec le bois de plaie (WW) qui forme un nouveau cerne continu. Barre d'échelle=1mm. 92

Figure 18 : Observations macroscopiques en fluorescence d'une coupe transversale d'une blessure 31 mois après l'injection (A) Le point d'injection est bien fermé. (B) Zoom du bois de plaie (WW) dans l'axe de la perforation. Il n'y a que peu de vaisseaux formés. Les rayons ligneux sont chargés de composés foncés (étoile). Barre d'échelle : A=1mm; B=0,2mm. 93

Figure 19 : Schéma d'évolution d'une blessure d'injection montrant les différentes modifications tissulaires au niveau de l'écorce et du tissu xylémien. ASL=Assise subéro-ligneuse ; BP=Bois de plaie. 96

Figure 20 : Evolution des concentrations de difénoconazole dans les secteurs haut et bas du feuillage en fonction du temps (a) après 1 injection, (b) après 6 injections. LOQ=0,01. 126

Figure 21 : Analogie entre le modèle pharmacocinétique mono-compartmental après administration orale d'un médicament chez l'animal ou l'homme et un modèle phyto-pharmaceutique mono-compartmental après injection dans le tronc d'un arbre d'une préparation phytopharmaceutique. 128

Figure 22 : Représentation schématique de la pharmacocinétique foliaire après injection dans le tronc, soit d'une substance active injectée sous forme de trois préparations différentes, A, B et C ; ou de trois substances actives différentes, A, B et C. 128

Figure 23 : Photographies de la distribution d'une solution d'éosine ou d'une solution de bleu de bromophénol après leur injection dans un tronc de pommier montrant la sectorisation et la rotation de la distribution. (a) Section transversale du tronc : au point

d'injection (0 cm) et tout les 20 cm. Les images sont orientées selon le même axe ; (b) Observation de la surface de deux tronçons consécutifs de tronc après écorçage montrant le parcours longitudinal de l'injection de bleu de bromophénol. Echelle = 5 mm..... 134

Figure 24 : Observation de la distribution de l'éosine après l'intersection d'une branche après injection dans un tronc de pommier. (a) Vue par-dessous de l'axe principal du tronc ; (b) Vue d'une section de la branche immédiatement après l'intersection. Echelle = 5 mm..... 135

Figure 25 : Observation macroscopique en fluorescence d'une coupe transversale au niveau d'un point d'injection d'une solution d'éosine d'éosine. Echelle = 1 mm. 135

Figure 26 : Photographies de la distribution d'une solution d'éosine ou d'une solution de bleu de bromophénol après leur injection dans un tronc de Châtaignier. (a) Section transversale du tronc : au point d'injection (0 cm) et tout les 20 cm. Les images ont toutes la même orientation ; (b) Observation de la surface de trois tronçons consécutifs de tronc après écorçage montrant le parcours longitudinal de l'injection d'éosine à partir du point d'injection. Echelle : a = 1 cm ; b = 5 cm. 137

Figure 27 : Photographies de la distribution d'une solution d'éosine ou d'une solution de bleu de bromophénol après leur injection dans un tronc de pin. (a) Section transversale du tronc au point d'injection (0 cm) ; (b) Section transversale 10 cm au-dessus des points d'injection, à l'intersection de quatre branches. Vue par-dessus. La flèche indique l'axe de la branche observée en (d) ; (c) Section transversale 10 cm au-dessus de l'intersection ; (d) Même section transversale qu'en (b) mais vue par-dessous et montrant la section d'une des branches partant de l'intersection. Echelle = 1 cm. 139

Figure 28 : Schémas des dispositifs expérimentaux utilisés pour étudier l'adsorption des substances actives dans le bois *in vitro*. 147

Figure 29 : Schéma du protocole expérimental utilisé pour étudier l'adsorption des substances actives dans le bois *in vitro*. 148

Figure 30 : Quantités d'imidaclopride absorbées dans les feuilles par trois sections successives de branches de pommier en fonction de la hauteur des sections et de la position des feuilles sur le egment, exprimée en μg . Les barres d'erreur indiquent l'erreur standart. Les lettres inscrites au dessus des batons indiquent les différences significatives entre les échantillons, ($p\text{-value} < 0,05$). $n=3$ 152

Figure 31 : Transpiration en ml/cm^2 dans les feuilles jeunes et matures. ** indique une différence significative (T-Test, $p\text{-value} < 0,01$)..... 153

Figure 32 : Concentrations, exprimées en ng/g , d'imidaclopride (a) et de fluoranthène (b) dans les feuilles apicales et dans des tronçons de tiges en fonction de la hauteur de migration, après absorption de ces molécules par des branches excisées de pommier. NB, Le segment de tige trempant dans la solution a préalablement été retiré. 154

Figure 33 : Concentrations, exprimées en ng/g , d'imidaclopride (a) et de fluoranthène (b) et dans les aiguilles et dans des tronçons de tiges en fonction de la hauteur de migration, après absorption de ces molécules par des branches excisées de pin. NB, le segment de tige trempant dans la solution a été retiré. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur standart. $n=3$ 155

Figure 34 : Cinétique d'adsorption de différentes substances actives dans les feuilles après absorption par des branches excisées de pommier, en présence ou non de Tween 20

dans la solution d'adsorption. (a) imidaclopride ; (b) pyriméthanil ; (c) difénoconazole. Les résultats sont exprimés en ng/g en fonction du nombre de jours. n=4. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur standard. *** indique une différence significative (p-value<0,001). 156

Figure 35 : Concentrations, exprimées en ng/g, de difénoconazole dans des tronçons de tige et dans les feuilles en fonction de la hauteur de migration, après absorption de ces molécules par des branches excisées de pommier sans ou avec 1% de Tween 20® dans la solution d'absorption. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur standard. n=4. 157

Figure 36 : Cinétique d'adsorption sur du bois de pommier de (a) l'imidaclopride et (b) du difénoconazole, exprimée en pourcentage d'adsorption..... 158

Figure 37 : Isothermes d'adsorption des substances actives sur le bois de pommier, selon la formulation de Langmuir pour (a) l'imidaclopride, (b) le pyriméthanil, (c) le tébuconazole, (d) le difénoconazole. Ce : concentration à l'équilibre de la solution d'adsorption, exprimée en mg/L ; Cs : concentration à l'équilibre sur le bois, exprimée en mg/kg..... 159

Figure 38 : Isothermes d'adsorption des substances actives sur le bois de pommier, linéarisées selon la formulation de Freundlich, (a) imidaclopride ; (b) pyriméthanil ; (c) tébuconazole et (d) difénoconazole, . Ce : concentration à l'équilibre de la solution d'adsorption, exprimée en mg/L ; Cs : concentration à l'équilibre sur le bois, exprimée en mg/kg..... 160

Figure 39 : Relation en le coefficient KF et le Kow. Kf calculé à partir des isothermes de Freundlich ; Kow extrait de la littérature..... 162

Figure 40 : Isothermes d'adsorption et de désorption, linéarisées selon la formulation de Freundlich, de (a) le difénoconazole et (b) le pyriméthanil sur du bois de pommier. Ce : concentration à l'équilibre de la solution d'adsorption, exprimée en mg/L ; Cs : concentration à l'équilibre sur le bois, exprimée en mg/kg..... 163

Figure 41 : Evolution du taux d'adsorption du piryméthanile, du tébuconazole et du difénoconazole sur du bois de pommier en fonction du pourcentage (m/V) de TA dans la solution. A : SDS ; B : Tween20®. Les flèches indiquent la CMC des TA. 164

Figure 42 : Schéma du dispositif utilisé pour mesurer l'effet de la viscosité d'une solution sur le débit de sève sur des branches excisées de différentes essences d'arbre.168

Figure 43 : Evolution de la vitesse de la sève dans les branches de différentes essences d'arbre en fonction de la viscosité de la solution. 170

Figure 44 : Schéma du flux d'une substance active lipophile dans les vaisseaux xylémiens après injection d'une préparation micellaire de la substance active et processus de sorption de la substance active sur les parois après dissociation des micelles dans le flux de sève. 173

Figure 45 : Schéma expérimental utilisé pour déterminer l'activité antifongique des différentes substances actives..... 179

Figure 46 : Courbes de dose-réponse obtenues pour chaque champignon avec les trois substances actives. 183

Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des molécules testées dans ce chapitre.....	143
Tableau 2 : Gamme de concentrations des solutions d'exposition initiales du bois pour les 4 molécules testées.....	150
Tableau 3 : Pourcentage de transfert dans les feuilles des substances actives en présence ou non de Tween 20® (Tw20) dans la solution d'adsorption après 3 jours et pourcentage de variation du transfert.	157
Tableau 4 : Constantes d'adsorption des quatre molécules calculées après linéarisation selon la formulation de Freundlich de l'isotherme d'adsorption sur du bois de pommier.	160
Tableau 5 : Constante d'inhibition 50 (IC50) de l'adsorption des substances actives sur le bois de pommier par les TA et Constante de Hill (pente de la tangente au point d'inflexion) des courbes dose-effet.	164
Tableau 6 : Pourcentage de réduction de la vitesse de circulation de la sève dans les branches de différents arbres en fonction de la viscosité.	170
Tableau 7 : Concentrations en substances actives : concentration dans la solution appliquée sur les boîtes de petri (0,35 mL/boîte) et concentration finale dans les 10 ml de PDA.....	180
Tableau 8 : DL50 obtenues avec les nanoparticules d'argent, l'allicine et le thiabendazole contre les six champignons testés (mg/L)	184
Tableau 9 : Comparaison de l'efficacité des substances actives entre elles. p-values obtenues avec l'Anova.	185

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1. La lutte contre les maladies et les ravageurs chez les arbres

Les ravageurs, insectes, acariens, et les maladies fongiques ou bactériennes causent des dégâts importants sur les arbres en zones agricoles et non agricoles. Ces attaques peuvent engendrer des pertes de rendement en arboriculture ou en plantation forestière, ainsi que des problèmes esthétiques, sanitaires ou de conservation du patrimoine en zone urbaine et en forêt. Ces dégâts tendent à augmenter de pair avec les effets du changement climatique et la libéralisation des échanges commerciaux (Simon and Brun, 2011; Kenis *et al.*, 2019). Les arbres étant des cultures pérennes, il est plus difficile de contrôler les ravageurs que sur des cultures annuelles. Les pathogènes peuvent s'installer et être conservés voire se multiplier d'une année sur l'autre.

En zone agricole, la lutte contre ces ravageurs et ces maladies est une part importante des dépenses liées à la production fruitière pour répondre, notamment, à la forte demande dans ce domaine pour atteindre les standards de qualité réclamés par les consommateurs. L'utilisation de produits phytosanitaires pour cette lutte contre les bioagresseurs s'est intensifiée ces dernières décennies permettant une augmentation significative des rendements, bien qu'on note actuellement une volonté sociétale et politique d'aller vers une réduction de leur usage.

La lutte contre les bioagresseurs des arbres en zone urbaine ou en forêt avec des produits phytosanitaires est aussi un challenge du fait du risque d'exposition à ces produits pour une population non professionnelle et de la contamination de l'environnement. Les insectes ravageurs endommagent environ 35 millions d'hectares de surface forestière tous les ans (Kenis *et al.*, 2019) et certaines problématiques restent sans solutions. De plus, une réglementation plus contraignante a récemment été mise en place en France pour protéger la population et l'environnement. Réglementation qui, à terme, interdit l'utilisation des pesticides dans ces zones non agricoles (Loi Labbé modifiée par l'article 68 de la LTE et la loi Pothier). En outre, la hauteur des arbres, notamment en zone urbaine, ne permet pas toujours de traiter efficacement l'intégralité du houppier ou de la canopée avec les techniques actuelles (Bock *et al.*, 2013).

Face aux contraintes liées à cette utilisation intensive de produits phytosanitaires, des méthodes d'applications plus économes en pesticides se sont développées, en plus de méthodes de lutte alternatives telles que la lutte biologique.

1.1 Les méthodes de lutte antiparasitaire

Les méthodes de lutte contre les ravageurs et les maladies peuvent être biologiques, chimiques, culturales, génétiques et physiques. Elles doivent être choisies en fonction du mode de culture ainsi que du degré de sévérité de l'atteinte parasitaire et peuvent être utilisées seules ou combinées.

- Les méthodes culturales sont des modifications de pratiques au niveau de la plantation ou des activités de maintenance qui permettent de réduire ou de prévenir des dommages à la culture. Il peut s'agir d'adapter les pratiques culturales liées à la taille, à l'irrigation, aux amendements, à la densité de plantation ou au travail du sol (Aubertot *et al.*, 2005).
- La lutte variétale ou génétique consiste en la plantation de variétés résistantes aux bioagresseurs. En arboriculture, c'est une méthode prometteuse. Toutefois, les variétés résistantes ne sont pas toujours adaptées aux exigences du marché. Par exemple, en verger de pommiers, les variétés résistantes à la tavelure ont parfois des calibres de fruits trop faibles pour une valorisation commerciale ou la peau trop épaisse pour le consommateur (Aubertot *et al.*, 2005; Brown and Maloney, 2008).
- Les méthodes de lutte physiques consistent à prévenir ou supprimer des populations de ravageurs en utilisant des processus uniquement physiques. Il peut s'agir de modifier les conditions environnementales en changeant la température, la lumière ou l'humidité qui perturbent le cycle de vie ou de développement des parasites. Par exemple, des éclaircissements de la canopée ou des peuplements sont réalisés pour augmenter l'exposition au soleil et la circulation de l'air afin de réduire l'humidité (Dreistadt *et al.*, 2016; Vincent and Panneton, 2019). Des méthodes de lutte mécanique directe sont essentiellement utilisées en agriculture biologique. Par exemple, il peut s'agir de décapage à l'eau à haute pression, brossage des troncs, utilisation de bandes collantes pour empêcher les insectes de monter le long des troncs ou section des pousses envahies par les pucerons (Aubertot *et al.*, 2005; Dreistadt *et al.*, 2016). Les méthodes mécaniques indirectes permettent souvent de réduire l'inoculum, par exemple en enfouissant les feuilles tombées au sol (Vincent

and Panneton, 2019). Aussi lorsqu'un pathogène a été introduit dans une zone, une propagation peut s'ensuivre. Pour éviter cette épidémie ou la limiter, les arbres hôtes de la maladie peuvent être supprimés et brûlés. Cette technique permet d'éliminer le pathogène et l'empêcher de s'étendre à d'autres plantes. En vergers de pommiers, la mise en place de filet au-dessus de la canopée, technique qui se développe de plus en plus, a montré son efficacité dans la lutte contre le carpocapse. Ces filets perturbent les vols des imagos et ainsi la reproduction de ces papillons.

- Il existe aussi les méthodes de lutte dites naturelles telles que la lutte biologique et l'utilisation de biopesticides qui peuvent être utilisées en agriculture biologique, mais aussi en zone non agricole. La lutte biologique utilise l'introduction d'ennemis naturels tels que des parasites pour contrôler des ravageurs. Il est possible de libérer des agents de biocontrôle, mais il reste moins cher et recommandé de conserver des populations naturellement présentes en formant, par exemple, des haies ou des bosquets qui constituent un habitat-réservoir pour ces populations d'insectes (Dib *et al.*, 2010). Parmi les biopesticides, la confusion sexuelle repose sur la saturation de l'atmosphère de la parcelle avec des molécules de synthèse analogues aux phéromones femelles. Cette saturation rend les mâles incapables de trouver les femelles pour s'accoupler. Il existe aussi des extraits végétaux ayant un pouvoir insecticide, antibactérien ou fongicide comme l'allicine que l'on retrouve dans l'ail ou le carvacrol présent dans l'origan (Abbaszadeh *et al.*, 2014).
- Actuellement la protection en arboriculture et en viticulture se fait essentiellement par voie chimique par pulvérisation aérienne. En zones non agricoles, seuls les arbres ayant une valeur importante ou placés en zone urbaine ou résidentielle sont généralement traités. Cette méthode de traitement dite conventionnelle présente, malgré son efficacité, un certain nombre de défauts. D'une part, à cause des molécules utilisées, qui peuvent présenter pour certaines un risque pour l'homme ou l'environnement. D'autre part, parce que ce mode d'application ne permet pas de restreindre le traitement uniquement à la cible parasitaire. De ce fait, une proportion importante du produit peut être appliquée en pure perte.

1.2 Méthodes d'application des produits de protection des plantes sur les arbres

La méthode d'application des produits phytosanitaires la plus employée actuellement est la pulvérisation, principalement sur les parties aériennes. L'arboriculture utilise essentiellement des appareils à jet porté tel que l'atomiseur mais, quel que soit le type d'appareil utilisé, la pulvérisation entraîne une dérive du produit pulvérisé. Seulement une plus ou moins faible quantité de produits atteint la cible, le reste se disperse dans l'air ou retombe au sol, engendrant une possible contamination non intentionnelle et par conséquent une perte d'efficacité de la pulvérisation (Figure 1). Des études ont montré que seulement 29% à 56% de la bouillie pulvérisée atteignait la frondaison. La dérive est fortement influencée par le vent, le type de végétation et le matériel, notamment le type de buse utilisé et le volume de bouillie (Herrington, Mapothera and Stringer, 1981; Cross *et al.*, 2001).

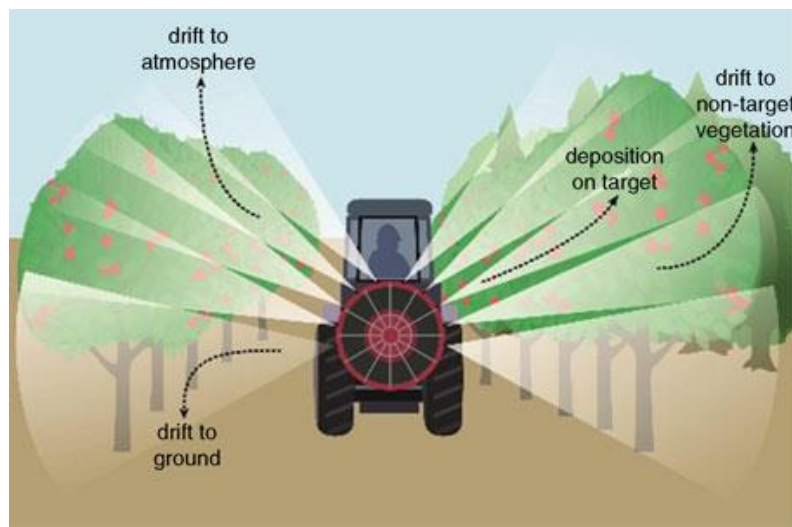


Figure 1 : Types de dérive dans l'environnement liées à la pulvérisation (d'après Wise et al., 2014).

De nouvelles pratiques et de nouveaux équipements ont permis de réduire cette dérive. Par exemple, les nouveaux pulvérisateurs sont équipés de tunnel ou de collecteurs pour récupérer les pertes mais ils sont encore peu utilisés (Pergher *et al.*, 2013; Pergher and Zucchiatti, 2018).

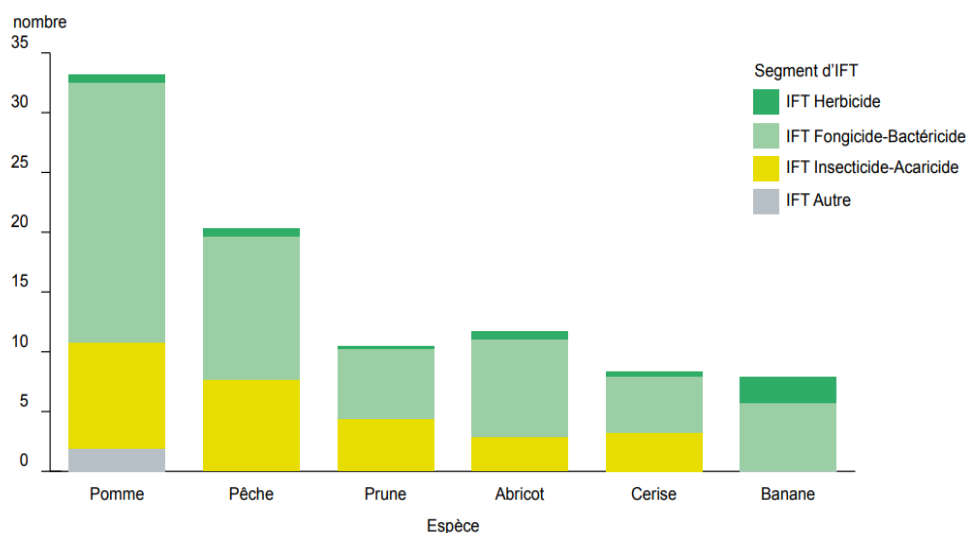
Les produits systémiques peuvent être aussi appliqués sur le sol, ils atteignent ensuite le système vasculaire de la plante en entrant par les racines. Néanmoins, l'efficacité est

généralement moindre qu'avec la pulvérisation et la dérive peut-être aussi importante (Fettig, Grosman and Munson, 2013; Hu, Jiang and Wang, 2018). La pulvérisation sur le tronc est une autre méthode employée sur les arbres. Toutefois, son efficacité est limitée puisque les produits doivent passer au travers de l'écorce pour atteindre le système vasculaire. En général, cette pratique est plutôt réservée à des traitements hivernaux pour lutter contre les formes de conservation des parasites.

Enfin, une méthode testée depuis de nombreuses années, mais d'utilisation très marginale et qui prend tout son sens dans la politique actuelle de réduction de l'usage des pesticides, est la méthode d'injection des produits phytosanitaires dans le tronc des arbres. Elle semble être une méthode alternative aux méthodes citées précédemment (Joseph J. Docola *et al.*, 2012). C'est une méthode plus respectueuse de l'environnement puisque les produits sont disposés à l'intérieur de l'arbre, abolissant à priori les risques de dérive (Fettig, Grosman and Munson, 2013). Cette méthode développée ci-après (Chapitre 2) a fait l'objet d'une revue publiée dans le journal Crop Protection (Berger and Laurent, 2019).

1.3 Vers une réduction de l'usage des produits phytosanitaires

Le plan Ecophyto II+ prévoit une réduction de 50%, de l'usage des produits phytosanitaires d'ici 2025 tout en conservant, a minima, un niveau d'efficacité de protection équivalent à celui actuel. Néanmoins, les technologies de traitement phytosanitaire existantes sont limitées et, malgré des progrès dans le domaine et la volonté des agriculteurs, elles n'ont pas permis d'atteindre encore une telle réduction. De plus, même si l'utilisation intensive des produits phytosanitaires est limitée par des contraintes sanitaires, environnementales et réglementaires, elle reste la méthode de lutte la plus employée. En arboriculture, la fréquence des traitements peut être très élevée. Par exemple, les vergers de pommiers figurent parmi les cultures les plus traitées, avec un indicateur de fréquence de traitement (IFT) de plus de 30 en 2015 (Figure 2)(Lauri *et al.*, 2011). Cet indice élevé est essentiellement dû à la lutte contre la tavelure (*Venturia inaequalis*). Les normes de qualité en vigueur étant très exigeantes (refus de la récolte au-delà de 1% de surface tavelée du fruit), la végétation a besoin d'être traitée dès l'apparition de la tavelure et jusque tard dans la saison. Cet effet est accentué par le cycle du champignon qui requiert un traitement après chaque épisode de pluie.



Source : Agreste - Enquête Pratiques culturales en arboriculture 2015

Figure 2 : Indicateur de fréquence de traitement (IFT) moyen selon les espèces en 2015.

Le défi majeur pour la filière arboricole est de réduire ce nombre de traitements et de trouver des solutions alternatives aux pratiques actuelles. L'injection dans le tronc des arbres se présente donc comme l'une d'entre elles.

2. Article 1 : L'injection dans le tronc des arbres de produits phytopharmaceutiques pour lutter contre les bioagresseurs

Article 1 : Trunk injection of plant protection products to protect trees from pests and diseases

Article accepté dans *Crop Protection* le 28 mai 2019

Cyndel Berger, François Laurent

Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

Corresponding author: François Laurent, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

E-mail: francois.laurent@inra.fr

Phone: +33(5)82066357

RESUME

Il est nécessaire de trouver une alternative aux méthodes traditionnelles d'application des produits phytosanitaires afin de limiter les risques pour les consommateurs, les utilisateurs et l'environnement. La lutte contre les ravageurs et les maladies des arbres fruitiers, des forêts et des arbres d'ornement par injection de produits phytosanitaires dans le tronc est une stratégie prometteuse pour éviter les risques associés à la pulvérisation. Cette méthode respectueuse de l'environnement, développée depuis de nombreuses années suite à l'émergence de problèmes phytosanitaires, notamment sur des espèces forestières, a récemment trouvé un regain d'intérêt avec l'apparition des nouveaux produits de lutte biologique et de technologies d'injection plus favorables à la santé des arbres. Nous comparons ici les dispositifs d'injection existants et leurs impacts sur l'arbre. Nous nous

concentrons dans cet article sur les avantages et les inconvénients de l'endothérapie vis-à-vis de l'arbre, de l'environnement et de la santé humaine. Nous discutons également des facteurs qui influencent l'efficacité de l'injection dans le tronc, notamment les caractéristiques des produits chimiques et des agents de lutte biologique, l'anatomie et la physiologie des arbres. L'adéquation entre l'apparition d'un parasite ou d'une maladie et le moment des injections a également une influence sur l'efficacité de cette méthode alternative de traitement.

ABSTRACT

An alternative to the conventional delivery methods of pesticides is needed to limit risks for consumers, users and the environment. Managing pests and diseases in orchards, forests and urban environment using trunk injection of plant protection products is a promising strategy to reduce the risks associated with spraying. This environmentally friendly method was developed in the years following the emergence of phytosanitary problems and new scientific knowledge in the field. Recently, renewed interest in the trunk injection method has emerged following the apparition of new biological control agents and technologies which are more tree-friendly. Here we compare existing injection devices and their impact on trunk injection. We focus on the advantages and drawbacks of endotherapy with respect to environmental concerns and the risks for tree and human health. We also discuss the factors that influence the effectiveness of the trunk injection including the characteristics of the agrochemicals and biological control agents, tree anatomy and physiology. The match between pest or disease occurrence and the timing of the injections also has an influence on the success of this alternative treatment method.

Key words: Tree trunk injection, Pest management, Disease control, Endotherapy, Plant protection products

1. Introduction

In orchards and forests, applying pesticides using conventional methods - spraying or soil drenching for example - is the currently most common approach used for pest management. Although pesticides are useful to treat pests, they can have several collateral effects, all the more when they are misused (Perry et al., 1991). These include pollution of environment, risks for users and consumer exposure. Foliar spraying is the most common

way of applying pesticides to trees but the efficiency of spraying is limited by losses due to drift, and spraying is difficult or impractical for large trees, such as ash or chestnut trees, and is sometimes restricted or prohibited in the proximity of urban area (Aćimović et al., 2016; Wise et al., 2014). Legislation in the USA and Europe has led to the elimination or restriction of the use for many pesticides with the aim of making pesticide use consistent with the concept of sustainable development, meaning alternative approaches are needed (Aćimović et al., 2014). Among these, tree trunk injection is a promising way to deliver agrochemicals in many tree species while reducing environmental impacts and eliminating spray drift (Wise et al., 2014). This application method can be used in forests, orchards and urban area such as gardens and parks (Coslor et al., 2018a; Doccola et al., 2012; Ferracini and Alma, 2008; Kobza et al., 2011). Endotherapy enables plant protection products to be supplied directly to the vascular system to avoid root or cuticle barriers and to disperse the plant protection products inside the plant (Fettig, 2013a). This method is used to deliver most plant protection products, provided the characteristics are compatible with apoplastic transport to obtain a good uptake and minimize phytotoxic effect (Bromilow and Chamberlain, 1988). It can deliver agrochemicals and biological control agents, and can thus be classified as an environmental friendly way of controlling bacteria, fungi, nematodes, insects, and phytoplasma (Aćimović et al., 2015; Byrne et al., 2012; Hu and Wang, 2016; Percival and Boyle, 2005). Trunk injection can also allow to deliver growth regulators, defense activators, plant bio-stimulant and fertilizers (Aćimović et al., 2015; Bahadou et al., 2017; Dal maso et al., 2017; Fernandez-Escobar et al., 1993). After outlining the history of trunk injection and the recent advances, the different devices used to inject trees are reviewed. The factors that influence the effectiveness of the method along with its advantages and potential drawbacks are discussed. Finally, this review article address the future research needs in the field.

2. History and recent advances

Injecting chemicals into the trunks of trees has a long history with disparate results. Several attempts have been made to use the technique over the centuries but without success. In the 15th century, Leonardo da Vinci was the first to attempt to inject trunk. He introduced arsenical and other poisonous solutions in apple trees, through bore holes, in order to make fruit poisonous (Roach, 1939; Stoddart and Dimond, 1949). More recently,

in the 19th century, new experimentations in the field of plant injection brought developments of the method. Hartig, in 1853, was the first to inject liquid into a hole from a container outside the tree. Iron salts have been injected in solution with this method to correct a deficiency disease (Roach, 1939; Stoddart and Dimond, 1949). In 1894, Ivan Shevyrez was the pioneer in the way to use tree injection for purposes of pest control in the USA, followed more recently by American, French, Italian, English and German workers (Rumbold, 1920). However, in this century lack of knowledge in basic science was an obstacle to understanding experiments in trunk injection. Roach and Rumbold compiled works between the 12th century and the early 20th century (Roach, 1939; Rumbold, 1920). The most widely used substances in that period were dyes and salts. More recent research in the 20th century produced new knowledge in botany, plant physiology, agriculture and forestry. How tissues healed after injury was better understood and described as compartmentalization by Shigo (1977). The 20th century also saw the emergence of the cohesion-tension theory for the movement of water in trees by Dixon-Joly and Askenasy (Dixon and Joly, 1895). Renewed interest in trunk injection emerged following the spread of dutch elm disease (*Ophiostoma Ulmi* Buisson) in the USA in the 1940s (Burkhard et al., 2015; Perry et al., 1991). Management of dutch elm disease fungus by injection of fungicides have shown good results (Haugen and Stennes, 1999; Karnosky, 1979; Perry et al., 1991). To identify the path of water conduction in trees, Kozlowski injected dyes into the stem of forest trees (Kozlowski et al., 1967). In the 1990s and 2000s, the spread of invasive and new pests and diseases across the world revived research on trunk injection. In the USA, the method is mostly used to treat tree-killing insects such as the emerald ash borer (*Agrilus planipennis* Farimaire) (Grimalt et al., 2011), longhorn beetle (*Anoplophora glabripennis* Motschulsky) (Ugine et al., 2013) and hemlock woolly adelgid (*Aldelges tsugae* Annand) (Docola and Wild, 2012). Endotherapy has also been used to control the horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimic) in Europe (Kobza et al., 2011), pine wilt nematodes (*Bursaphelenchus xylophilus* Steiner et Buhrer) in Asia and Europe (Sousa et al., 2013) and the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier) in the Middle East, North Africa and Europe (Burkhard et al., 2015). Furthermore, successful control of fungicides by trunk injection has already been reported (Amiri et al., 2008; Dal Maso et al., 2014; Percival and Boyle, 2005). Trunk injection of phosphite against *Phytophthora* species has become a common practice in forests and orchards (Akisanmi and Drenth, 2013; Garbelotto et al., 2007). More recently, there has been renewed interest in trunk injection as an alternative to spraying in orchards and in

landscapes where other methods cannot be applied or are ineffective, and to limit non-target exposure (Aćimović et al., 2015). For instance, trunk injection has been studied to control fire blight (*Erwinia amylovora* Burrill) in apple trees and downy mildew (*Plasmopora viticola* Berk. et Curt.) in vines (Aćimović et al., 2014; Düker and Kubiak, 2009). Trunk injection of antibiotics and plant activators (i.e. SAR inducers) appears to be the only effective method available to control citrus huanglongbing caused by the systemic pathogen *Candidatus liberibacter* Garnier (Hu and Wang, 2016; Hu et al., 2017; Puttamuk et al., 2014; Shin et al., 2016). Systemic acquired resistance (SAR) can be activated by either the pathogen infection itself or by applying chemical inducers to the plant. SAR inducers are usually applied as foliar sprays or soil drenching (Wise, 2016), but some authors have investigated the delivery of SAR inducers to the vascular system by trunk injection. Aćimović et al. (2015) reported significant control of fire blight in apple trees by injecting acibenzolar-S-methyl and potassium phosphite. Similarly, Hu et al. (2017) tested several SAR inducers including salicylic acid, oxalic acid, acibenzolar-S-methyl and potassium phosphate, applied by trunk injection to control citrus huanglongbing. Results showed positive control of the disease. As acibenzolar-S-methyl and salicylic acid are sensitive to environmental conditions and to photodegradation, application by trunk injection may avoid these problems (Hu et al., 2017). The injection of new plant protection products compounds, RNAi and bacteria, has emerged in recent years and is expanding. Trunk injection of RNA molecules is an innovative method of control by targeting insect pests with lethal genes (Dalakouras et al., 2018; Hunter et al., 2012; Joga et al., 2016). Endophytic bacteria and fungi are promising biological control agents for trunk injection. They have been shown to produce good results against *Phytophthora* species on *Quercus robur* L. and *Fagus sylvatica* L., and for fire blight control in pear and apple (Bahadou et al., 2017; Berger et al., 2015).

3. Injection as an alternative to spraying?

Foliar spraying is the most frequently used way of applying pesticides for pest management in trees. However, the limits of spraying are extensive pesticide losses. According to Pimentel (1995), only 0.4% of active substance actually reaches the target pest. However, the operational target is the canopy and losses depend on the type of vegetation, the growing season, the weather and the sprayers used. Atmospheric drift

consists of droplet dispersion during spraying, and of pesticide vapors during and after spraying (Gil and Sinfort, 2005; Lichiheb et al., 2016; Van den Berg et al., 1999; Zivan et al., 2016). Drift is greatly affected by wind conditions (Cross et al., 2001a). Droplets and drips from the tree contribute to ground drift (Deskeyser et al., 2014; Grella et al., 2017). For example, widely used equipment like axial fan sprayers result in large quantities of product deposited on the ground (Cross et al., 2001a). In vineyards, Bonicelli et al. (2010) showed 30%–40% of air dispersion, whatever the stage of development of the vines. In the case of a high density canopy, ground drift was reduced by from 40% in the early stages to 10% in July when the canopy was most dense. In orchards, several authors reported losses of more than 50% of the spray due to the use of axial fan sprayers (Cross, 1991; Herrington et al., 1981). Such environmental contamination and inefficient use of pesticides is no longer acceptable. Much effort has been invested in modifying existing axial fans and in adapting sprayers to structure of canopies (Duga et al., 2015; Khot et al., 2012). New practices and new spraying equipment can reduce losses by up to 67%, although losses remain significant (70% in some cases) (Holownicki et al., 2000; Pergher et al., 2018). New sprayers including tunnel and recycling sprayers can reduce droplet drift by collecting losses from the canopy (Pergher et al., 2013, 2018). The use of low-volume sprayers reduces losses but increase the variability of leaf deposit because it more specifically targets the plucking surface (Cross et al., 2001b). The volume of water does not affect total deposits, only percentage surface coverage (Wise et al., 2010). All these problems are amplified in the case of tall trees (10 m and above) such as chestnut, pecan or urban trees that are sprayed using ground-based air-blast sprayers. Spray deposits are considered to decline with tree height (Bock et al., 2013, 2015). In one of the rare studies on tall trees, Bock et al. (2015) showed that the percentage of deposit depends on the height of pecan leaves in the canopy: spray coverage ranged from 73.5% at 5 m to 0.02% at 15 m, even if no linear relationship was identified between the height of leaf sampling and percentage coverage. Soil drenching is considered as an alternative to spraying and can reduce chemical losses. This method involves applying chemicals to the soil around the tree for root uptake (Hu et al., 2018). Soil drenching is used for chemicals like neonicotinoid insecticides to treat Florida citrus to control the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama) and citrus leafminers (*Phyllocnistis citrella* Stainton), which are linked to the spread of citrus huanglongbing and citrus canker diseases, respectively (Fletcher et al., 2018; Rogers, 2012). Soil application is also used for the systemic acquired resistance inducer, acibenzolar-S-methyl (Graham and Myers, 2016). However, the

fraction of chemicals, for example, of imidacloprid, uptaken by plants can be low and the rest remain in the soil for a long time (Fletcher et al., 2018; Laurent and Rathahao, 2003). The remaining fraction can have adverse effects on soil arthropods, as it is prescribed for the control of soil parasites (Altmann, 1990). Soil drenching is also limited by the need to apply high rates of chemicals and by soil microbial degradation of the active substances (McCoy, 1976; Hu and Wang, 2016). Due to these risks for the environment and for human health, alternative methods to spraying and soil drench, such as trunk injection, are needed, and current European legislation limits or prohibits pesticide spraying in the proximity of urban areas (Directive, 2009/128 CE), reinforcing the interest in alternatives to spraying. Tree trunk injection has many advantages making this integrative pest management method an interesting alternative to spraying and soil drench. At equivalent dosage, trunk injection provides a higher quantity of plant protection products to trees because the whole dose is delivered in the sap flux. That avoids soil deposition, drift losses or photolysis and microbial degradation at leaf surface (Docola and Wild, 2012; Fidgen et al., 2013). The closed system reduces non-target impacts and user exposure (Fettig et al., 2013b). Injection also controls borers that feed under the bark where compounds sprayed onto the surface of trees cannot penetrate in sufficient concentrations (Docola and Wild, 2012). One advantage of trunk injection may be the persistence of action reported in some studies, meaning one treatment per year – or at even longer intervals - may suffice (Docola and Wild, 2012; Fidgen et al., 2013). For example, Grosman et al. (2010) evaluated injections of experimental formulations of emamectin benzoate for preventing ponderosa pine (*Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws.) mortality from colonization by western pine beetle (*Dendroctonus brevicornis* LeConte) in California, and reported three years of protection with a single injection. The cost per tree injection is higher than one spray application because of the labor required, but fewer applications and less solution are required, making it an affordable investment in many cases (Littardi et al., 2013; Wise, 2016).

4. Injection methods and devices

Trunk injection is still evolving but is now tending to be more widely used thanks to technological progress on the devices and formulations adapted for injection. Generally, two parts must be distinguished in injection methods and associated devices: tools to set

up the injection port (drilling with bite or needle perforation) and material to deliver the product (open tank, pressurized capsule, syringe, etc.).

4.1. Drill-based versus drill-free devices

There are two categories of injection processes based on the way the hole is made: methods that involve drilling a hole in the trunk with a bit before using the injection device, and needle-based techniques without preliminary drilling. The majority of techniques are drill-based. Drilling can cause friction to the tissues because of the drill speed, causing damage and hence reducing uptake (Montecchio, 2013). Only two needle-based systems have been developed to prevent the potential tree injury: BITE® technology (P.A.N srl, Padova, Italy) and Wedgle® Direct Inject (ArborSystems LLC, NE USA) (Smith and Lewis, 2005) (Fig. 1A and B). BITE is time consuming because it is a passive system. The method relies on intensive sap flow to allow a rapid uptake of the solution. Aćimović et al. (2016) compared injection ports made by drilling and needle-based tree injection technologies on apple trees. The injection port that healed the fastest was shown to be the lenticular port created by BITE®. The slowest was the 9.5 mm drill port sealed with Arborplug® (ArborJet Inc., MA USA). It is necessary to continue to develop non-drilling methods to limit injection wound.

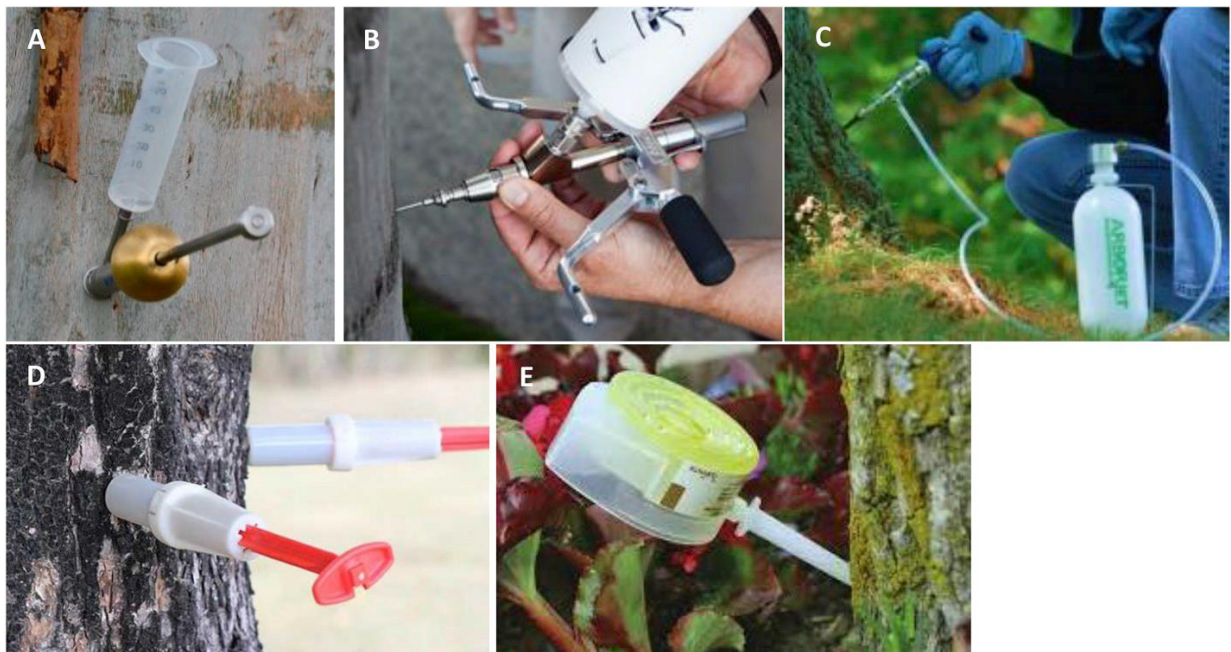


Fig. 1. Existing trunk-injection devices. (A) Bite®, (B) Wedgle® Direct-Inject System, (C) Quick-jet® microinjection system, (D) ChemJet® Tree Injector, (E) Mauget®.

Table 1
Various methods and devices used in endotherapeutic experiments.

Kind of hole	Type of technology	Name of the device	Diameter of the hole (mm)	Depth of the hole (mm)	Pressure (kPa)	References
Drilled	Syringe plus drip	Quick-jet [®] micro-injection system (ArborJet Inc, MA USA)	9–9.5	25.4–120	Hand pressure ^a	(Aćimović et al., 2015; Byrne et al., 2014; Doccola et al., 2012)
		Tree IV [®] Micro-infusion System (ArborJet Inc., MA USA)	9–9.5	16–120	207–414	(Aćimović et al., 2015; Doccola et al., 2012)
		Viper [®] micro-injection system (ArborJet Inc, MA USA)	7.4–9.5	15–40	241–4136	(Aćimović et al., 2015; Doccola et al., 2007)
	Drip	Stemject [®] (Chemicolour Industries Ltd., Auckland, NZ)	6–8	25–100	3000–4000	(Darrieutort and Lecomte, 2007; Dula et al., 2007)
		Sidewinter [®] precision injector (Sidewinter Pty Ltd., Australia)	6	40	<4000	Xu et al. (2009)
	Drill combined with injector Syringe	ChemJet [®] Tree Injector (Chemjet Trading Pty. Ltd., Australia)	4.2	25–50	Coil spring ^a	(Düker and Kubiak, 2009; Shin et al., 2016)
		Avo-ject [®] syringe injector (Aongatete coolstores Ltd., NZ)	7.5	30	Coil spring ^a	Puttamuk et al. (2014)
	Capsule	EcoJect [®] system (BioForest Technologies Inc., Canada)	5.6–5.8	13–19	379 kPa–448	(Booth and Johnson, 2009; Grimalt et al., 2011)
		Tree tech [®] microinjection system (Tree tech microinjection system FL USA)	3–5	5	65	(Kobza et al., 2011; Percival and Boyle, 2005)
	Implant	Mauget [®] (Mauget Company, CA USA)	4	6–30	Hand pressure ^a	(Cowles et al., 2006; Raupp et al., 2008; Young, 2002)
Drill free (needle)	Open drip	Acecap [®] (Creative Sales, Inc, NE USA)	9–9.5	3.2	Natural uptake	(Doccola et al., 2011; Raupp et al., 2008)
		BITE [®] (P.A.N srl, Padova, Italy)	3.5	20	Natural uptake	(Dal Maso et al., 2014; Montecchio, 2013)
	Syringe	Wedgle [®] Direct-Inject System (ArborSystems LLC, NE USA)	2–2.8	4–19	Hand pressure ^a	(Cowles et al., 2006; James et al., 2006; Rosenberg et al., 2012)

^a Pressure of injection is not indicated.

4.2. Types of delivery tools

After the port is made, the plant protection product in solution can be introduced in the trunk in different ways. Table 1 and Fig. 1 show various devices used for trunk-injection. Most involve a capsule with a canula or a syringe that is inserted into the hole to inject the solution. Other devices are tubing with a pump or a drill coupled with an injector. Acecaps® (Creative Sales, Inc, NE USA) are implants that are inserted into holes drilled into the tree. ArborJet devices (ArborJet Inc, MA USA) use a syringe for single or multiple injections from a central unit with delivery tubes connected to the tree (Fig. 1C). Injection methods also differ in the diameter of the hole ranging from 2 mm to 9.5 mm. The needles and capsule tubes are usually round whereas BITE® (P.A.N srl, Padova, Italy) is a manual, drill-free instrument with a small, perforated lenticular (lentil shaped) blade that enters the trunk. The depth of the injection varies between and within methods since different needle sizes are used that are adapted to the morphology of the target trees. The injected solution moves inside the trunk by natural uptake or is forced under pressure. Most used are high pressure devices whose pressure ranges from 207 kPa to 450 kPa. Viper® (ArborJet Inc, MA USA) and Stemjet® (Chemicolour Industries Ltd., Auckland, NZ) technologies can inject solutions at very high pressure, up to 3000 kPa. With capsules, implants and with the Wedgle® Direct Inject (ArborSystems LLC, NE USA), the volume injected is very small, from 1 to 5 mL, but aside from these methods, the injected volume is generally larger and depends on the specific experiment, not on the device.

5. Factors influencing the effectiveness of trunk injection

Translocation of agrochemicals inside the tree and the effectiveness of injection are affected by many factors including the properties of the plant protection products, tree anatomy and physiology, the type of pest, environmental conditions and the method used.

5.1. Factors related to application methods

Both the application techniques and the devices influence uptake, i.e. injection pressure, drilling, the location, depth, angle and diameter of the hole, and the shape of the needle or syringe (Hu and Wang, 2016; Sánchez-Zamora and Fernández-Escobar, 2004, 2000). Currently, an effort is underway to develop techniques that make a clean cut with a smaller diameter and a shallower hole. The smaller the diameter of the hole, the faster the

wound heals (Perry et al., 1991). The use of drilling methods has negative side effects such as loss of functionality of adjacent woody tissues and delayed hole closure. Injection methods without drilling limit these effects (Montecchio, 2013). The shape of the needle influences the wound created and the seal mechanism during trunk injection. They can be round shaped, with a screw thread, or lenticular shaped. Lenticular shaped ports, such as BITE® (P. A.N srl, Padova, Italy), may cause minimal injury to woody tissues because they separate the fibers instead of round shape needles that cut the fibers (Montecchio, 2013). Depending on the shape of the needle, cracks may appear, resulting in weak sealing performance (Shang et al., 2011). Different species have naturally different uptake speeds, consequently it may be useful to use pressure for the slowest species (Navarro et al., 1992). The injection time is influenced by the use of pressure and the volume of compound injected. High pressure and small volumes reduce the time it takes to deliver agrochemicals by trunk injection. High pressure makes it possible to injecting larger amounts of product into the vascular system but this can cause injuries such as cambial damage, bark lesion, that is, bark can separate and split (Montecchio, 2013). Also, if air enter the injection hole causing cavitation, water column is interrupted and the uptake is stopped (Perry et al., 1991). By applying high pressure, leaks of the injected product can appear. The use of seal or septum can limit this problem (Aćimović et al., 2016). By using natural uptake, less injury may be caused but the time required for application is longer and highly dependent on weather conditions (Aćimović et al., 2016; Montecchio, 2013).

5.2. Factors related to the plant protection products

5.2.1. Agrochemicals

Translocation of organic compounds inside a plant depends on the water solubility, lipophilicity, molecular weight, polarity, pH and formulation of the product (Percival and Boyle, 2005). In conventional spraying of pesticides, the most important factor governing the movement of chemicals inside plants is lipophilicity, namely the octanol/water partition coefficient (K_{ow}), due to the need for the molecule to cross the lipid membrane to reach the vascular xylem (Bromilow and Chamberlain, 1988). If the injection supplies the chemicals directly to the xylem sap, this factor could be less important. Cellulose and hemicellulose, the main constituents of vessel walls, are polar and have low absorption capacity of aromatic compounds, such as pesticides (MacKay and Gschwend, 2000). However, lignin, which impregnates polysaccharide polymers of vessel walls, is

hydrophobic, sorbs hydrophobic organic compounds and can retain active substances in the vessel walls. Softwoods are composed of 40–44% of cellulose and 25–31% of lignin. Hardwoods have a lower lignin content (18–25%), and are therefore likely to have a lower sorption capacity for lipophilics (MacKay and Gschwend, 2000). The other main property of a molecule that influences the transfer through bio-membranes is the dissociation constant (pKa) (Sur and Stork, 2003). In phloem, the pH is basic, around 8, while in xylem, the pH is more acidic, about 5. These differences in pH do not affect the distribution of neutral compounds between xylem and phloem, but (Chamberlain, 1988). Chemicals that are weak acids accumulate in the plant compartments with a high pH, where they are trapped in the phloem (Bromilow and Chamberlain, 1988; Sur and Stork, 2003). Most non-ionized compounds can move freely between xylem and phloem but tend to be carried away by the xylem flux that has the greater sap flow (Bromilow and Chamberlain, 1988). pH values differ among tree species and therefore the partition of active substances between symplastic (phloem) and apoplastic (xylem) vessels depends on species. pH can also vary with the season (Alves et al., 2004). Other properties of agrochemicals such as molecular weight and partitioning of compounds onto organic matter can also influence systemic transfer (Aitchison et al., 2000; Bromilow and Chamberlain, 1988). Compounds with high K_{oc} values limit long-distance transport in the tree but this process is a function of lipophilicity (Bromilow and Chamberlain, 1988). Currently, commercial formulations designed for spraying are not necessarily compatible with optimized vascular transfer because the sprayed molecules can remain inside or on the surface of the leaves where the pest is present and do not need to be transported. To modify the physical-chemical properties of active substances and to improve their distribution inside the tree, formulation is essential. To increase the efficiency of the injection, formulations need to deal with water solubility and low K_{ow} (Docola et al., 2007; Docola and Wild, 2012; Montecchio, 2013; Young, 2002). Indeed, highly lipophilic compounds (log K_{ow} > 4) sorb onto plant solids, including xylem tissues. Compounds with a log K_{ow} ¼ 1.8 have an optimal translocation potential (Aitchison et al., 2000; Trapp et al., 1994). Formulation can allow better translocation of compounds with a high K_{ow} and prevent them from bonding to lignin. Very water-soluble chemicals are transported to the leaves but are not available for very long.

5.2.2. *Biological pest control agents*

Endophytic bacteria can be transported by the xylem and reach the leaves. It seems they use their flagella and/or the transpiration stream to attain the vegetative plants parts. Their size does not interfere with their ability to pass through the vessels elements (Compant et al., 2010). Similarly, the size of the plate and pit holes allows the passage of fungal conidia but there is a lack of knowledge on the characteristics related to the capacity of fungus and bacteria injected to move inside the vessels and reach the target. Efficacy will depend on the mode of protection generated by the bacteria and fungus, efficacy of the agent itself or of its secondary metabolites, hence the need to better understand the mode of action of endophytes, or others bacteria and fungus, to optimize their use (Berger et al., 2015).

5.2.3. *RNAi*

RNA interference (RNAi) occurs in most eukaryotes that function as regulators of gene expression by targeting specific RNAm sequences. Gene silencing by double stranded RNA (dsRNA) has been used in crop protection. Phloem is considered as the preferential channel for the transport of RNA where it can remain stable over time because phloem sap is free of RNase (Joga et al., 2016; Melnyk et al., 2011). The size of the plasmodesmata can limit the transfer of RNAi within the plant (Melnyk et al., 2011). Trunk injection can be used to deliver RNAi-based insecticides to control insect pests in trees (Li et al., 2015; Zotti et al., 2018). By contrast to endogenous RNAi, trunk injection delivers double stranded RNA (dsRNA) to the xylem, dsRNA is then translocated inside the tree via apoplastic transport where plasmodesmata are not present (Dalakouras et al., 2018). Formulations with viruses, bacteria, chemically modified molecules, polymers or liposomes could increase the ability of dsRNA to reach the target and improve efficacy (Dalakouras et al., 2018; Joga et al., 2016). This method would then be more effective for the control of sap-sucking insects than for chewing insects that mostly feed on leaves (Joga et al., 2016).

5.3. *Influence of tree anatomy and physiology on the transfer*

Some biological factors related to plant physiology and anatomy including tree species, size, health status, xylem architecture and the phenological stage can affect the distribution of the plant protection product (Sánchez-Zamora and Fernández-Escobar, 2000). As in all plants, tree water flux from roots to leaves is driven by aspiration due to

the leaf transpiration, and flux is maintained continuous by capillarity forces according to tension-cohesion theory (Dixon and Joly, 1895; Hacke et al., 2006; Venturas et al., 2017). Injecting the chemicals directly into xylem tissues enables the translocation of compounds via the transpiration stream (Chaney, 1986). Most of the vascular system is composed of secondary xylem and phloem tissues produced by the vascular cambium. The xylem is made up of different proportions of vessels, tracheids, fibers and parenchyma cells organized differently depending on the tree species (Chaney, 1986; Pallardy, 2010). The properties of the xylem that facilitate the radial and vertical distribution of active substances are high density of vessels, large vessel diameter, increased intervessel contact, high density of intervessel pits and the porosity of the pits (Orians et al., 2005; Zanne et al., 2006). Broadleaves (hardwoods) and conifers can be distinguished by the anatomy of their vascular system. A gymnosperm, e.g. a pine, spruce, or fir, are non-porous trees. Their xylem is only composed of one type of cell, tracheids. Tracheids range from 10 to 20 μm in diameter with lateral connections, in the form of pits, between the tracheids (Chaney, 1986; Sperry et al., 2006). Because of the small diameter of these cells, the movement of the injected compound is slowed down; there are more resistance points than in large vessels like in xylem types of hardwoods. Conifers also have resin canals in the xylem that can reduce the uptake of the injected compounds (Sánchez-Zamora and Fernández-Escobar, 2004, 2000). They use seven to ten rings to transport sap, and consequently also for the translocation of the injected compounds (Chaney, 1986). The xylem of angiosperms is composed of both vessels and tracheids connected to each other and to vessels by small pits (Chaney, 1986). In angiosperms, there are two kinds of xylem arrangements: ring porous trees such as chestnut, ash and elm; and diffuse porous trees, such as poplar, apple and willow (Pallardy, 2010). Vessels are 10–200 μm in diameter and up to 10 m in length. They can be both larger in diameter and longer in ring porous trees than in diffuse porous trees (Chaney, 1986; Hacke et al., 2006; Hacke and Sperry, 2001). Vessels in diffuse porous trees are uniformly dispersed among the tracheids in each annual growth ring whereas, in ring porous trees, wider vessels in the xylem are predominant in the early wood while the vessels are smaller in diameter or absent in latewood (Chaney, 1986). Organic chemicals in broadleaf trees move mainly in the one to three outer annual rings (Chaney, 1986; Kozłowski et al., 1967). The kind of xylem influences hole depth. In ring porous xylem, shallow injections are more reliable because 90% of the hydric activity takes place in the current annual ring. Diffuse porous trees also use the three outer rings but the distribution between the rings is more balanced, only 70% of the sap moves via the outer

ring, so injecting into more than one ring is ideal (Chaney, 1986; Kozłowski et al., 1967). Differences in the transport of nutritional resources through plants among genera and species are highly dependent on the xylem pathway from the roots to the leaves. The ascent of sap can be sectorial, preferentially using paths with the most direct vascular connections (Kozłowski et al., 1967; Orians et al., 2005; Zanne et al., 2006). Trees with a great degree of radial sectoriality move resources mainly in the longitudinal plane and have a low radial diffusion. Lateral movement by radial diffusion occurs in trees with a greater degree of integration such as diffuse porous trees (Aćimović et al., 2014; Hu and Wang, 2016; Larson et al., 1994; Tanis et al., 2012). Some species, including elm and apple, have a spiral grain leading to a sectorial winding ascension of the injected compound, that results in good distribution throughout the species, including ash, have a straight grain, meaning the compounds follow a sectorial straight transport in line with the location of the injection (Chaney, 1986; Kozłowski et al., 1967). Sectorial sap flow leads to irregular distribution of the injected compounds in the canopy resulting in variable control (Byrne et al., 2012; Orians et al., 2004). Because of this architecture, multiple injection ports spaced radially around the stem are required to achieve uniform distribution in the tree canopy. Aćimović et al. (2014) found a minimum of four injection ports were required in 29-year-old apple trees with trunk diameter of 30 cm at a height of 28.5 cm from the ground. A study on citrus trees by Hu and Wang (2016) recommended the use of two injection ports for five year old trees with a trunk diameter of 9 cm 15 cm above the bud union. After injection, tree metabolism can modify the efficacy of the injected compounds, limiting the length of effectiveness (Tanis et al., 2012). When injected, active substances may be protected from UV degradation or outside biodegradation. However, chemicals could be degraded by plant metabolism, too. First, it can occur in xylem tissues, which is a rich peroxidase tissue for biosynthesis of the lignin polymers. Some chemicals could be trapped in lignin, as bound residues, by copolymerization with lignin monomers. Secondly, they can be degraded in leaf parenchyma by xenobiotic metabolism pathways (Roberts, 2000).

5.4. Influence of weather conditions on uptake in trees

The time of the year and climatic conditions also influence translocation of the compounds after injection. Consequently, atmospheric conditions, i.e. light, wind, relative humidity, and temperature need to be taken into account. Weather conditions such as high humidity and low sunlight have a negative effect on the process of absorption of agrochemicals inside the plant, whereas rain and wind do not slow down the process

(Littardi et al., 2013). The amount of vapor pressure in the atmosphere is a major factor because a decrease in vapor pressure increases the transpiration rate. The ideal conditions for stomata in the tree canopy to be open and for a high transpiration capacity are sunny and windy weather with substantial water supply in the soil (Doccola et al., 2007; Fettig et al., 2013b). The best uptake usually occurs in spring during the most intensive transpiration periods and in summer with the new green growth in the canopy, but multi-season injections, such as an injection in late summer or early fall, can be used to provide protection for the following year (Fettig et al., 2013b).

5.5. Matching pest occurrence and timing of injection

Several factors related to pests can influence the efficiency of injection: the pest or disease itself, the period of occurrence and infestation pressure, or the nature of impacted tissue. First, the pest must be distinguished from disease management due to mobility or impacted tissue. Piercing-sucking insects have to be distinguished from chewing insects or borers. Piercing-sucking insects feed on the sap directly in vascular bundles while chewing insects and borers eat either the whole leaves, or only the parenchyma, and bark or wood. Concerning disease management, a distinction should be made between ecto- or endo-parasites, and in all cases, between fungi, bacteria or viruses. Efficiency depends on which tissues, parenchyma, phloem or xylem tissues, are impacted. In all cases, a good correlation must be found between plant protection products localization, over time or in the tissues, and the location of the parasite inside the tree. Systemic pathogens, such as those that cause Dutch elm disease (*Ophiostoma Ulmi* Buisman), probably come into contact with injected compounds earlier and at higher concentrations than in the case of diseases limited to the leaves and fruit, such as apple scab (*Venturia inaequalis* Cooke). Indeed, the injected preparations will be at higher concentrations in the xylem vessels where injections are located, and then presumably diluted by the xylem sap or by foliage biomass (Byrne et al., 2014). It is important to choose the best timing for the injection to ensure the peak concentration of the compound matches the period with the highest pest pressure (Byrne et al., 2014). In the most complete study on this topic, Byrne et al. (2014) showed that the choice of the appropriate stage of the tree is primordial for efficiency of treatment but that timing also depends on the active substance. Due to its rapid distribution within trees, acephate is appropriate to control sudden outbreaks of thrips whatever the flush period. By contrast, imidacloprid is most effective when injected during the mid-flush period and subsequently reaches optimum levels in the leaves when the thrips actively feed on young

leaf tissues (Byrne et al., 2014). To control pests that attack the developing tissues or attack early in the growing season, injections in the fall or in the early spring can insure translocation before damage occurs (Cook et al., 2013). Similarly, Fettig et al. (2014) showed that emamectin benzoate has to be injected into the lodge pine trunk (*Pinus Contorta* Douglas) one year before the protection is needed against mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae* Hopkins). While the time of the injection the previous year is not important, it must allow good distribution of the active ingredient in the targeted pine tissues (Fettig et al., 2014). A less appropriate time of injection may require increasing the dose of the active substance (Kobza et al., 2011). As infestation may vary from year to year, the number of treatments and the timing have to be adapted accordingly. What is more, some treatments do not produce good results when applied as a curative treatment, but are efficient preventive measures, in which case the product has to be injected earlier (Berger et al., 2015).

6. Risks related to trunk injection

6.1. Risks for trees

By creating a hole in bark and in the sapwood, injection involves some risks for tree health. Aćimović et al. (2016) compared drill- and needle-based tree-injection techniques to investigate port closure, bark cracking and callus formation in apple trees. He showed that port closure took from one year to more than two years and that the lenticular port left by the blade healed fastest. Working in peach trees, Cooley et al. (1992) found no evidence of significant damage to the tree after two years but wounds were not closed by callus formation. Percival and Boyle recorded total wound closure by measuring callus formation at the end of the first growing season in apple trees and English oak (Percival and Boyle, 2005). Doccola et al. (2011) reported that green ash grew over 80% of the injured vascular system in two years with no signs of negative impacts on tree health. However, wound closure is only one aspect of many physiological responses of trees. Visual observations of the external wound left by injection showed trunk splitting, bark separation, fluxing of sap, and in the inner tissues, wood staining and decay (Aćimović et al., 2016; Perry et al., 1991; Shigo et al., 1977). If high rates of chemicals are used, long term and permanent injuries may occur, including leaf yellowing or leaf death, or reduced fruit yield (Aćimović et al., 2016). Tree health and longevity may also be affected by the wound created by the

injection, as the port is an entry point for pathogens and insects (Ferracini and Alma, 2008; Percival and Boyle, 2005; Perry et al., 1991). After injection, wounds are usually compartmentalized by walls that confine the injured tissues, and repeated injection over time can lead to a majority of occluded or walled vessels, making further injections impossible (Shigo, 1984; Shigo et al., 1977; Smith and Lewis, 2005). Numerous studies have reported no external symptoms of phytotoxic effects associated with trunk injection treatments (Fettig et al., 2013c; Grosman et al., 2010). However, fluxing of sap and bleeding can occur around the injection openings, which could be misperceived and considered unsightly in urban environment and therefore undesirable (Fettig et al., 2013c; Perry et al., 1991).

6.2. Risks for humans and the environment

When spraying methods are used, the main chemical risk is to the workers who do the spraying and who are exposed to high concentrations of agrochemicals. It is clear that injection limits that risk. However, workers can be exposed when handling the product, for example when preparing the spray, or by leaks during injection, especially when high pressure is used. On the other hand, the risks for consumers of the presence of the chemicals in food can be assessed in the same way as for conventional treatments. In fruit trees, it is crucial to use the optimal amount of the active substance that produces the necessary efficacy with residue levels in fruits below the maximum residue levels MRLs defined by authorities (Directive, 2009/128 CE). When acephate is injected into the avocado trunk to control thrips on young fruits, efficient concentrations are found in the fruits but residue levels are below the MRLs at harvest (Byrne et al., 2012). Similarly, when injected in the trunk before blossom, residues of abamectin, emamectin benzoate or imidacloprid in apples are below the U.S. MRLs at harvest, whereas they are still found in the leaves (Coslor et al., 2018b). Correct application may also prevent toxicity for pollinators exposed to agrochemicals, when sprayed, by contact from drift but also after spraying when pollinators are feeding on the target plant. Studies have shown that most of the residues end up in the foliage but some have been detected, at low levels, in flowers and fruits (Byrne et al., 2014, 2012; Coslor et al., 2018a; Hu and Wang, 2016; VanWoerkom et al., 2014; Wise et al., 2014). The timing of the injection can be used to control the levels of pesticide to insure residues are below the maximum permitted level in fruits. For direct control of fruit pests, the concentration must be sufficient to be effective against the pest while ensuring relatively low residues in the fruit at harvest.

7. Conclusion and future research needs

Trunk injection could thus be a valuable alternative to spraying, particularly to reduce the use of pesticides. Tree injection could be workable when traditional methods, such as soil and foliar applications, are restricted, difficult or ineffective. Trunk injection reduces farm workers' exposure to agrochemicals as well as risks for the environment. Trunk injection avoids drifting of plant protection products, leaf wash off, biotic and abiotic degradation, such as microbial or photochemical degradation, at the leaf surface. By reducing losses of plant protection products, trunk injection is expected to reduce the dose required in comparison with that required for spray applications. However, this could be counteracted by metabolism of the plant protection product in the tree. There is a need for further research to better deliver efficient product concentrations to target sites. The main challenge is identifying homogeneous concentrations in trees to achieve optimum efficiency while avoiding too weak concentrations in some parts of the canopy that could lead to the development of tolerant hotspots. This last point could be a limiting factor in the further development of trunk injection. However, much remains to be done to adapt the preparation of a wider range of active substances to this method, which has now fully demonstrated its relevance. It may also be useful to develop new compounds or to rehabilitate less lipophilic active substances that move more easily in the xylem. This is especially true for fungicides that generally require more complete leaf coverage than insecticides. Other investigations are needed to determine the most efficient number of injection points for each tree species and each trunk diameter, but probably also to pests or pathogens of interest. The last technical point is the need to insure the injection date, which is specific to each substance, coincides with the period during which the substance is required to act. This is indisputably the most difficult challenge to meet because of the time needed for the compound to be distributed within the tree. This adds an additional parameter compared to the optimization of a foliar treatment. Finally, trunk injection for isolate trees can result in saving time and money by reducing the number of application and the dosage compared to conventional spray application. However, in fruit production, trunk injection requires time and labour due to the high tree density, which can result in an increase in cost. Economic studies are needed to show that trunk injection can be competitive in commercial production context.

Acknowledgment

This work was supported by grants from the French “Competitiveness Cluster Program – Single Interdepartmental Fund, BPI France Funding, France”.

References

Ćimović, S.G., Cregg, B.M., Sundin, G.W., Wise, J.C., 2016. Comparison of drill- and needle-based tree injection technologies in healing of trunk injection ports on apple trees. *Urban For. Urban Green.*, Special Section: Power in urban social-ecological systems: Processes and practices of governance and marginalization, 19, pp. 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2016.07.003>.

Ćimović, S.G., VanWoerkom, A.H., Reeb, P.D., Vandervoort, C., Garavaglia, T., Cregg, B.M., Wise, J.C., 2014. Spatial and temporal distribution of trunk-injected imidacloprid in apple tree canopies. *Pest Manag. Sci.* 70, 1751–1760. <https://doi.org/10.1002/ps.374>.

Ćimović, S.G., Zeng, Q., McGhee, G.C., Sundin, G.W., Wise, J.C., 2015. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Front. Plant Sci.* 6, 16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00016>.

Aitchison, E.W., Kelley, S.L., Alvarez, P.J.J., Schnoor, J.L., 2000. Phytoremediation of 1,4-Dioxane by hybrid poplar trees. *Water Environ. Res.* 72, 313–321. <https://doi.org/10.2175/106143000X137536>.

Akinsanmi, O.A., Drenth, A., 2013. Phosphite and metalaxyl rejuvenate macadamia trees in decline caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Crop Protect.* 53, 29–36.

Altmann, R., 1990. NTN 33893 a novel systemic insecticide offering new possibilities for control of leaf and soil insects. Presented at the Seconde Conference Internationale sur les parasites de l’agriculture, 2005 December 4-6; Versailles, France. *Ann. AMPP* 1, 297, 1990.

Alves, G., Ameglio, T., Guillot, A., Fleurat-Lessard, P., Lacointe, A., Sakr, S., Petel, G., Julien, J.-L., 2004. Winter variation in xylem sap pH of walnut trees: involvement of plasma membrane H⁺-ATPase of vessel-associated cells. *Tree Physiol.* 24, 99–105. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.1.99>.

Amiri, A., Bussey, K.E., Riley, M.B., Schnabel, G., 2008. Propiconazole inhibits *Armillaria tabescens* in vitro and translocates into peach roots following trunk infusion. *Plant Dis.* 92, 1293–1298.

Bahadou, S.A., Ouijja, A., Boukhari, M.A., Tahiri, A., 2017. Development of field strategies for fire blight control integrating biocontrol agents and plant defense activators in Morocco. *J. Plant Pathol.* 99, 51–58. <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i0.3909>.

Berger, G., Czarnocka, K., Cochard, B., Oszako, T., Lefort, F., 2015. Biocontrol endotherapy with trichoderma spp. and *Bacillus amyloliquefaciens* against *phytophthora* spp.: a comparative study with phosphite treatment on *Quercus robur* and *Fagus sylvatica*. *J. Agric. Sci. Technol. A* 5, 428–439. <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2015.06.005>.

Bock, C.H., Brenneman, T.B., Hotchkiss, M.W., Wood, B.W., 2013. Trunk applications of phosphite for the control of foliar and fruit scab on pecan. *Crop Protect.* 54, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.04.015>.

Bock, C.H., Hotchkiss, M.W., Cottrell, T.E., Wood, B.W., 2015. The effect of sample height on spray coverage in mature pecan trees. *Plant Dis.* 997, 916–925. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1154-RE>.

Bonicelli, B., Naud, O., Rousset, S., Sinfort, C., De Rudnicki, V., Lescot, J.M., Ruelle, B., Scheyer, L., Cotteux, E., 2010. The challenge for precision spraying. In: Presented at the International Conference on Agricultural Engineering, September 2010, Clermont-Ferrand, France, p. 11.

Booth, M., Johnson, D., 2009. Pressurized-canister trunk injection of acephate, and changes in abundance of red elm bark weevil (*Magdalis armicollis*) on American elm (*Ulmus americana*). *Arboric. Urban For.* 35, 148–151.

Bromilow, R.H., Chamberlain, K., 1988. Designing molecules for systemicity. In: Atkin, R.K., Clifford, D.R. (Eds.), *Mechanisms and Regulation of Transport Processes*. British Plant Growth Regulator Group. Monograph 18.

Burkhard, R., Binz, H., Roux, C.A., Brunner, M., Ruesch, O., Wyss, P., 2015. Environmental fate of emamectin benzoate after tree micro injection of horse chestnut trees. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 297–302. <https://doi.org/10.1002/etc.2795>.

Byrne, F.J., Krieger, R.I., Doccola, J., Morse, J.G., 2014. Seasonal timing of neonicotinoid and organophosphate trunk injections to optimize the management of avocado thrips in California avocado groves. *Crop Protect.* 57, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.11.023>.

Byrne, F.J., Urena, A.A., Robinson, L.J., Krieger, R.I., Doccola, J., Morse, J.G., 2012. Evaluation of neonicotinoid, organophosphate and avermectin trunk injections for the management of avocado thrips in California avocado groves. *Pest Manag. Sci.* 68, 811–817. <https://doi.org/10.1002/ps.2337>.

Chaney, W.R., 1986. Anatomy and physiology related to chemical movement in trees. *J. Arboric. USA* 12, 85–91.

Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* 42, 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.

Cook, S.P., Sloniker, B.D., Rust, M.L., 2013. Efficacy of two bole-injected systemic insecticides for protecting Douglas-fir from damage by Douglas-fir tussock moth and fir coneworm. *West. J. Appl. Financ.* 28, 166–169. <https://doi.org/10.5849/wjaf.13-002>.

Cooley, D.R., Tattar, T.A., Schieffer, J.T., 1992. Treatment of X-disease of peaches using oxytetracycline microinjection capsules. *Hortscience* 27, 235–237.

Coslor, C.C., Vandervoort, C., Wise, J.C., 2018. Control of insect pests using trunk injection in a newly established apple orchard. *Int. J. Fruit Sci.* 1–14.

Coslor, C.C., Vandervoort, C., Wise, J.C., 2018. Insecticide dose and seasonal timing of trunk injection in apples influence efficacy and residues in nectar and plant parts. *Pest Manag. Sci.* 75, 1453–1463. <https://doi.org/10.1002/ps.5268>.

Cowles, R.S., Montgomery, M.E., Cheah, C.-J., 2006. Activity and residues of imidacloprid applied to soil and tree trunks to control hemlock woolly adelgid (*Hemiptera: adelgidae*) in forests. *J. Econ. Entomol.* 99, 1258–1267. <https://doi.org/10.1093/jee/99.4.1258>.

Cross, J.V., 1991. Deposits on apple leaves from medium volume, low volume and very low volume spray applications with an axial fan sprayer. *BCPC Monogr.* 46, 263–268.

Cross, J.V., Walklate, P.J., Murray, R.A., Richardson, G.M., 2001. Spray deposits and losses in different sized apple trees from an axial fan orchard sprayer: 1. Effects of spray liquid flow rate. *Crop Protect.* 20, 13–30. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00046-6](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00046-6).

Cross, J.V., Walklate, P.J., Murray, R.A., Richardson, G.M., 2001. Spray deposits and losses in different sized apple trees from an axial fan orchard sprayer: 2. Effects of spray quality. *Crop Protect.* 20, 333–343. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00163-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00163-0).

Dal Maso, E., Cocking, J., Montecchio, L., 2014. Efficacy tests on commercial fungicides against ash dieback in vitro and by trunk injection. *Urban For. Urban Green.* 13, 697–703.

Dal Maso, E., Cocking, J., Montecchio, L., 2017. An enhanced trunk injection formulation of potassium phosphite against chestnut ink disease. *Arboric. J.* 39 (2), 125–141. <https://doi.org/10.1080/03071375.2017.1345538>.

Dalakouras, A., Jarausch, W., Buchholz, G., Bassler, A., Braun, M., Manthey, T., Krczal, G., Wassenegger, M., 2018. Delivery of hairpin RNAs and small RNAs into woody and herbaceous plants by trunk injection and petiole absorption. *Front. Plant Sci.* 9, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01253>.

Darrieutort, G., Lecomte, P., 2007. Evaluation of a trunk injection technique to control grapevine wood diseases. *Phytopathol. Mediterr.* 46, 50–57.

Dekeyser, D., Foque, D., Duga, A.T., Verboven, P., Hendrickx, N., Nuyttens, D., 2014. Spray deposition assessment using different application techniques in artificial orchard trees. *Crop Protect.* 64, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.008>.

Dixon, H.H., Joly, J., 1895. On the ascent of sap. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 186, 563–576.

Doccola, J.J., Bristol, E.J., Sifleet, S.D., Lojko, J., Wild, P.M., 2007. Efficacy and duration of trunk-injected imidacloprid in the management of hemlock woolly adelgid (*Adelges tsugae*). *Arboric. Urban For.* 33, 12–21.

Doccola, J.J., Hascher, W., Aiken, J.J., Wild, P.M., 2012. Treatment strategies using imidacloprid in hemlock woolly adelgid (*Adelges tsugae* Annand) infested eastern hemlock (*Tsuga canadensis* Carrière) trees. *Arboric. Urban For.* 38, 41–49.

Doccola, J.J., Smitley, D.R., Davis, T.W., Aiken, J.J., Wild, P.M., 2011. Tree wound responses following systemic insecticide trunk injection treatments in green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.) as determined by destructive autopsy. *Arboric. Urban For.* 37, 6–12.

Doccola, J.J., Wild, P.M., 2012. Tree injection as an alternative method of insecticide application. In: *Insecticides - Basic and Other Applications*. Soloneski S and Larramendy M., Rijeka, Croatia, pp. 61–78.

Duga, A.T., Ruysen, K., Dekeyser, D., Nuyttens, D., Bylemans, D., Nicolai, B.M., Verboven, P., 2015. Spray deposition profiles in pome fruit trees: effects of sprayer design, training system and tree canopy characteristics. *Crop Protect.* 67, 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.10.016>.

Düker, A., Kubiak, R., 2009. Stem application of metalaxyl for the protection of *Vitis vinifera* L. ('Riesling') leaves and grapes against downy mildew (*Plasmopora viticola*). *Vitis* 48, 43–48.

Dula, T., Kappes, E.M., Horvath, A., Rabai, A., 2007. Preliminary trials on treatment of esca-infected grapevines with trunk injection of fungicides. *Phytopathol. Mediterr.* 46, 91–95.

Fernández-Escobar, R., Barranco, D., Benlloch, M., 1993. Overcoming iron chlorosis in olive and peach trees using a low-pressure trunk-injection method. *Hortscience* 28, 192–194.

Ferracini, C., Alma, A., 2008. How to preserve horse chestnut trees from *Cameraria ohridella* in the urban environment. *Crop prot* 9, 1251–1255. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.03.009>.

Fettig, C.J., Burnside, R.E., Schultz, M.E., 2013. Injection of emamectin benzoate protects paper birch from birch leafminer (*Hymenoptera: tenthredinidae*) for two field seasons. *J. Entomol. Sci.* 48, 166–168.

Fettig, C.J., Grosman, D.M., Munson, A.S., 2013. Advances in insecticide tools and tactics for protecting conifers from bark beetle attack in the western United States. In: Trdan, S. (Ed.), *Insecticides-development of Safer and More Effective Technologies*. Intech, Rijeka, Croatia, pp. 472–492.

Fettig, C.J., Grosman, D.M., Munson, A.S., 2013. Efficacy of abamectin and tebuconazole injections to protect lodgepole pine from mortality attributed to mountain pine beetle (*Coleoptera: Curculionidae*) attack and progression of blue stain fungi. J. Entomol. Sci. 48, 270–278. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-48.4.270>.

Fettig, C.J., Munson, A.S., Grosman, D.M., Bush, P.B., 2014. Evaluations of emamectin benzoate and propiconazole for protecting individual *Pinus contorta* from mortality attributed to colonization by *Dendroctonus ponderosae* and associated fungi. Pest Manag. Sci. 70 (5), 771–778.

Fidgen, J.G., Kittelson, N.T., Eckberg, T., Doccola, J., Randall, C., 2013. Field Note: emamectin benzoate reduces defoliation by *Choristoneura occidentalis* Freeman (*Lepidoptera: tortricidae*) on three host species. West. J. Appl. For. 28, 170–173. <https://doi.org/10.5849/wjaf.12-036>.

Fletcher, E., Morgan, K.T., Qureshi, J.A., Leiva, J.A., Nkedi-Kizza, P., 2018. Imidacloprid soil movement under micro-sprinkler irrigation and soil-drench applications to control Asian citrus psyllid (ACP) and citrus leafminer (CLM). PLoS One 13, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192668>.

Garbelotto, M., Schmidt, D.J., Harnik, T.Y., 2007. Phosphite injections and bark application of phosphite Pentrabark™ control sudden oak death in coast live oak. Arboric. Urban For. 33, 309.

Gil, Y., Sinfort, C., 2005. Emission of pesticides to the air during sprayer application: a bibliographic review. Atmos. Environ. 39, 5183–5193. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.05.019>.

Graham, J.H., Myers, M.E., 2016. Evaluation of soil applied systemic acquired resistance inducers integrated with copper bactericide sprays for control of citrus canker on bearing grapefruit trees. Crop Protect. 90, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.09.002>.

Grella, M., Gallart, M., Marucco, P., Balsari, P., Gil, E., 2017. Ground deposition and airborne spray drift assessment in vineyard and orchard: the influence of environmental variables and sprayer settings. Sustainability 9, 728. <https://doi.org/10.3390/su9050728>.

Grimalt, S., Thompson, D., Chartrand, D., McFarlane, J., Helson, B., Lyons, B., Meating, J., Scarr, T., 2011. Foliar residue dynamics of azadirachtins following direct stem injection into white and green ash trees for control of emerald ash borer. Pest Manag. Sci. 67, 1277–1284. <https://doi.org/10.1002/ps.2183>.

Grosman, D.M., Fettig, C.J., Jorgensen, C.L., Munson, A.S., 2010. Effectiveness of two systemic insecticides for protecting western conifers from mortality due to bark beetle attack. West. J. Appl. For. 25, 181–185. <https://doi.org/10.1093/wjaf/25.4.181>.

Hacke, U.G., Sperry, J.S., 2001. Functional and ecological xylem anatomy. Perspect. Plant Ecol. Evol. Systemat. 4, 97–115. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00017>.

Hacke, U.G., Sperry, J.S., Wheeler, J.K., Castro, L., 2006. Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiol.* 26, 689–701. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.6.689>.

Haugen, L., Stennes, M., 1999. Fungicide injection to control Dutch elm disease: understanding the options. *Plant Diagnosticians Quarterly* 20, 29–38.

Herrington, P.J., Mapother, H.R., Stringer, A., 1981. Spray retention and distribution on apple trees. *Pestic. Sci.* 12, 515–520.

Holownicki, R., Doruchowski, G., Godyn, A., Swiechowski, W., 2000. PA—precision agriculture: variation of spray deposit and loss with air-jet directions applied in orchards. *J. Agric. Eng. Res.* 772, 129–136. <https://doi.org/10.1006/jaer.2000.0587>.

Hu, J., Jiang, J., Wang, N., 2017. Control of citrus huanglongbing via trunk injection of plant defense activators and antibiotics. *Phytopathology* 108, 186–195. <https://doi.org/10.1094/PHTO-05-17-0175-R>.

Hu, W., Kuang, F., Chun, J., Lu, Z., Li, X., Zhao, Q., Zhong, B., Su, H., Zhang, Z., Zhang, N., 2018. Uptake of soil-applied thiamethoxam in orange and its effect against Asian citrus psyllid in different seasons. *Pest Manag. Sci.* 75, 1339–1345. <https://doi.org/10.1002/ps.5248>.

Hu, J., Wang, N., 2016. Evaluation of the spatiotemporal dynamics of oxytetracycline and its control effect against Citrus Huanglongbing via trunk injection. *Phytopathology* 106, 1495–1503. <https://doi.org/10.1094/PHTO-02-16-0114-R>.

Hunter, W.B., Glick, E., Paldi, N., Bextine, B.R., 2012. Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. *Southwest. Entomol.* 37, 85–87. <https://doi.org/10.3958/059.037.0110>.

James, R., Tisserat, N., Todd, T., 2006. Prevention of pine wilt of Scots pine (*Pinus sylvestris*) with systemic abamectin injections. *Arboric. Urban For.* 32, 195–201.

Joga, M.R., Zotti, M.J., Smaghe, G., Christiaens, O., 2016. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. *Front. Physiol.* 7, 14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00553>.

Karnosky, D.F., 1979. Dutch elm disease: a review of the history, environmental implications, control, and research needs. *Environ. Conserv.* 6, 311–322.

Khot, L.R., Ehsani, R., Albrigo, G., Larbi, P.A., Landers, A., Campoy, J., Wellington, C., 2012. Air-assisted sprayer adapted for precision horticulture: spray patterns and deposition assessments in small-sized citrus canopies. *Biosyst. Eng.* 113, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.06.008>.

Kobza, M., Juhásová, G., Adamčíková, K., Onrušková, E., 2011. Tree injection in the management of horse-chestnut leaf miner. *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: gracillariidae). *Gesunde Pflanz.* 62, 139–143. <https://doi.org/10.1007/s10343-011-0236-z>.

Kozlowski, T.T., Hughes, J.F., Leyton, L., 1967. Movement of injected dyes in gymnosperm stems in relation to tracheid alignment. *Forestry* 40, 207–219. <https://doi.org/10.1093/forestry/40.2.207>.

Larson, D.W., Doubt, J., Matthes-sears, U., 1994. Radially sectorial hydraulic pathways in the xylem of *Thuja occidentalis* as revealed by the use of dyes. *Int. J. Plant Sci.* 155, 569–582. <https://doi.org/10.1086/297195>.

Laurent, F.M., Rathahao, E., 2003. Distribution of [¹⁴C] imidacloprid in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) following seed treatment. *J. Agric. Food Chem.* 51, 8005–8010.

Li, H., Guan, R., Guo, H., Miao, X., 2015. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. *Plant Cell Environ.* 38, 2277–2285. <https://doi.org/10.1111/pce.12546>.

Lichiheb, N., Personne, E., Bedos, C., Van den Berg, F., Barriuso, E., 2016. Implementation of the effects of physicochemical properties on the foliar penetration of pesticides and its potential for estimating pesticide volatilization from plants. *Sci. Total Environ.* 550, 1022–1031. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.058>.

Littardi, C., Morelli, G., Bigel, R., Cinelli, F., Cangelosi, B., Curir, P., 2013. Contribution to the knowledge of medium and long term damage caused by trunk injections in the control of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (*Coleoptera: Curculionidae*). In: Presented at the Colloque méditerranéen sur les ravageurs des palmiers, Association Française de Protection des Plantes (AFPP), Nice, France.

MacKay, A.A., Gschwend, P.M., 2000. Sorption of monoaromatic hydrocarbons to wood. *Environ. Sci. Technol.* 34, 839–845. <https://doi.org/10.1021/es9900858>.

McCoy, R.E., 1976. Uptake, translocation, and persistence of oxytetracycline in coconut palm. *Phytopathology* 66, 1038–1042. Melnyk, C.W., Molnar, A., Baulcombe, D.C., 2011. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.* 30, 3553–3563.

Montecchio, L., 2013. A venturi effect can help cure our trees. *J. Vis. Exp.* 80, 1–8. <https://doi.org/10.3791/51199>.

Navarro, C., Fernández-Escobar, R., Benlloch, M., 1992. A low-pressure, trunk-injection method for introducing chemical formulations into olive trees. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 117, 357–360.

Orians, C.M., Smith, S.D.P., Sack, L., 2005. How are leaves plumbed inside a branch? Differences in leaf-to-leaf hydraulic sectoriality among six temperate tree species. *J. Exp. Bot.* 56, 2267–2273. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri233>.

Orians, C.M., Van Vuuren, M.M.I., Harris, N.L., Babst, B.A., Ellmore, G.S., 2004. Differential sectoriality in long-distance transport in temperate tree species: evidence from dye flow, ¹⁵N transport, and vessel element pitting. *Trees (Berl.)* 18, 501–509. <https://doi.org/10.1007/s00468-004-0326-y>.

Pallardy, S.G., 2010. Physiology of Woody Plants. Academic Press. Percival, G.C., Boyle, S., 2005. Evaluation of microcapsule trunk injections for the control of apple scab and powdery mildew. *Ann. Appl. Biol.* 147, 119–127. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.00019.x>.

Pergher, G., Gubiani, R., Cividino, S.R., Dell'Antonia, D., Lagazio, C., 2013. Assessment of spray deposition and recycling rate in the vineyard from a new type of air-assisted tunnel sprayer. *Crop Protect.* 45, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.11.021>.

Pergher, G., Zucchiatti, N., 2018. Influence of canopy development in the vineyard on spray deposition from a tunnel sprayer. *Journal of Agricultural Engineering* 49, 164–173. <https://doi.org/10.4081/jae.2018.801>. Perry, T.O.,

Santamour, F.S., Stipes, R.J., Shear, T., 1991. Exploring Alternatives to Tree Injection, vol. 17, pp. 217–226. Pimentel, D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *J. Agric. Environ. Ethics* 8, 17–29.

Puttamuk, T., Zhang, S., Duan, Y., Jantasorn, A., Thaveechai, N., 2014. Effect of chemical treatments on '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infected pomelo (*Citrus maxima*). *Crop Protect.* 65, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.07.018>.

Raupp, M., Ahern, R., Onken, B., Reardon, R., Bealmear, S., Doccia, J., Li, P.W., Becker, P., 2008. Efficacy of foliar applications, trunk injections, and soil drenches in reducing populations of elongate hemlock scale on eastern hemlock. *Arboric. Urban For.* 34, 325–329.

Roach, W.A., 1939. Plant injection as a physiological method. *Ann. Bot.* 3, 155–226. Roberts, T., 2000. Metabolism of agrochemicals in plants. In: Roberts, Terry (Ed.). John Wiley and Sons Ltd, Chichester, United Kingdom, p. 316. Rogers, M.E., 2012. Protection of young trees from the Asian citrus psyllid and HLB. *Citrus Ind.* 93, 10–15.

Rosenberg, O., Almqvist, C., Weslien, J., 2012. Systemic insecticide and gibberellin reduced cone damage and increased flowering in a spruce seed orchard. *J. Econ. Entomol.* 105, 916–922. Rumbold, C., 1920. The Injection of chemicals into chestnut trees. *Am. J. Bot.* 7, 1–20. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1920.tb05558.x>.

Sánchez-Zamora, M.A., Fernández-Escobar, R., 2000. Injector-size and the time of application affects uptake of tree trunk-injected solutions. *Sci. Hortic.* 84, 163–177. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00095-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00095-3).

Sánchez-Zamora, M.A., Fernández-Escobar, R., 2004. Uptake and distribution of trunk injections in conifers. *J. Arboric.* 30, 73–79.

Shang, Q., Liao, K., Liu, H., Zhao, B., 2011. Study on structure of needle head and seal mechanism of tree trunk injection. In: Presented at the Proceedings 2011 International Conference on Transportation, Mechanical, and Electrical Engineering (TMEE). IEEE, Changchun, China, pp. 813–816. <https://doi.org/10.1109/TMEE.2011.6199326>.

Shigo, A.L., 1977. Compartmentalization of decay in trees. Agric Inf Bull 405 Wash. DC US Dep. Agric. For. Serv. 405, 76. Shigo, A.L., 1984. Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. Annu. Rev. Phytopathol. 22, 189–214.

Shigo, A.L., Shortle, W., Garrett, P., 1977. Compartmentalization of discolored and decayed wood associated with injection-type wounds in hybrid poplar. J. Arboric. 3, 114–118.

Shin, K., Ascunce, M.S., Narouei-Khandan, H.A., Sun, X., Jones, D., Kolawole, O.O., Goss, E.M., van Bruggen, A.H., 2016. Effects and side effects of penicillin injection in huanglongbing affected grapefruit trees. Crop Protect. 90, 106–116.

Smith, K.T., Lewis, P.A., 2005. Potential concerns for tree wound response from stem injection. In: Presented at the Proceedings of the Third Hemlock Woolly Adelgid Conference, 2005 February 1–3; Asheville, NC. FHTET – 2005–01. U.S.Department of Agriculture, Forest Service, Forest Health Technology EnterpriseTeam, pp. 173–178.

Sousa, E., Naves, P., Vieira, M., 2013. Prevention of pine wilt disease induced by *Bursaphelenchus xylophilus* and *Monochamus galloprovincialis* by trunk injection of emamectin benzoate. Phytoparasitica 41, 143–148. <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0272-y>.

Sperry, J.S., Hacke, U.G., Pittermann, J., 2006. Size and function in conifer tracheids and angiosperm vessels. Am. J. Bot. 93, 1490–1500. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.10.1490>.

Stoddard, E.M., Dimond, A.E., 1949. The chemotherapy of plant diseases. The Botanical Review XV, 6, pp. 345–376. Sur, R., Stork, A., 2003. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. Bull. Insectol. 56, 35–40.

Tanis, S.R., Cregg, B.M., Mota-Sanchez, D., McCullough, D.G., Poland, T.M., 2012. Spatial and temporal distribution of trunk-injected ¹⁴C-imidacloprid in Fraxinus trees. Pest Manag. Sci. 68, 529–536. <https://doi.org/10.1002/ps.2281>.

Trapp, S., Matthies, M., McFarlane, C., 1994. Model for uptake of xenobiotics into plants: validation with bromacil experiments. Environ. Toxicol. Chem. 13, 413–422. <https://doi.org/10.1002/etc.5620130308>.

Ugine, T.A., Gardescu, S., Hajek, A.E., 2013. The within-season and between-tree distribution of imidacloprid trunk-injected into *Acer platanoides* (Sapindales: sapindaceae). J. Econ. Entomol. 106, 874–882. <https://doi.org/10.1603/EC12329>.

Van den Berg, F., Kubiak, R., Benjey, W.G., Majewski, M.S., Yates, S.R., Reeves, G.L., Smelt, J.H., Van der Linden, A.M.A., 1999. Emission of pesticides into the air. In: Fate of Pesticides in the Atmosphere: Implications for Environmental Risk Assessment. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 195–218.

VanWoerkom, A.H., Aćimović, S.G., Sundin, G.W., Cregg, B.M., Mota-Sanchez, D., Vandervoort, C., Wise, J.C., 2014. Trunk injection: an alternative technique for pesticide delivery in apples. Crop Protect. 65, 173–185.

Venturas, M.D., Sperry, J.S., Hacke, U.G., 2017. Plant xylem hydraulics: what we understand, current research, and future challenges. *J. Integr. Plant Biol.* 59, 356–389. <https://doi.org/10.1111/jipb.12534>.

Wise, J.C., 2016. enhancing performance of biorational insecticides with novel delivery systems in tree fruit IPM, chapter 5. In: Rami Horowitz, A., Ishaaya, I. (Eds.), *Advances in Insect Control and Resistance Management*. Springer Publishing Ltd., Dordrecht, Heidelberg, London, New York, pp. 77–92, 339. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31800-4>.

Wise, J.C., Jenkins, P.E., Schilder, A.M., Vandervoort, C., Isaacs, R., 2010. Sprayer type and water volume influence pesticide deposition and control of insect pests and diseases in juice grapes. *Crop Protect.* 29, 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.11.014>.

Wise, J.C., VanWoerkom, A.H., Acimovic, S.G., Sundin, G.W., Cregg, B.M., Vandervoort, C., 2014. Trunk injection: a discriminating delivering system for horticulture crop IPM. *Entomol. Ornithol. Herpetol. Curr. Res.* 3, 7. <https://doi.org/10.4172/2161-0983.1000126>.

Xu, T., Jacobsen, C.M., Hara, A.H., Li, J., Li, Q.X., 2009. Efficacy of systemic insecticides on the gall wasp *Quadrastichus erythrinae* in wiliwili trees (*Erythrina* spp.). *Pest Manag. Sci.* 65, 163–169. <https://doi.org/10.1002/ps.1663>.

Young, L.C., 2002. The efficacy of micro-injected imidacloprid and oxydemeton-methyl on red gum eucalyptus trees (*Eucalyptus camaldulensis*) infested with red gum lerp psyllid (*Glycaspis brimblecombei*). *J. Arboric.* 28, 144–147.

Zanne, A.E., Sweeney, K., Sharma, M., Orians, C.M., 2006. Patterns and consequences of differential vascular sectoriality in 18 temperate tree and shrub species. *Funct. Ecol.* 20, 200–206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01101.x>

Zivan, O., Segal-Rosenheimer, M., Dubowski, Y., 2016. Airborne organophosphate pesticides drift in Mediterranean climate: the importance of secondary drift. *Atmos. Environ.* 127, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.12.003>.

Zotti, M., Dos Santos, E.A., Cagliari, D., Christiaens, O., Taning, C.N.T., Smagghe, G., 2018. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Manag. Sci.* 74, 1239–1250. <https://doi.org/10.1002/ps.4813>.

3. Système vasculaire chez les espèces ligneuses

La technique d'injection dans le tronc vise à positionner les produits phytosanitaires directement dans le système vasculaire des arbres afin de profiter du courant de sève ascendant pour transporter ces produits vers la cible à atteindre dans les feuilles. L'injection dans le tronc permet de s'affranchir des barrières à la pénétration des produits de protection des plantes constituées par la cuticule des feuilles ou le périderme racinaire.

3.1 Structure générale

Comme dans toutes les plantes supérieures, le système vasculaire des arbres a pour fonction essentielle d'alimenter les différents organes en ressources nutritives minérales (eau, éléments minéraux, etc.) en provenance du sol ou en photosynthétats divers (sucres, acides aminés) en provenance des feuilles. Il joue aussi un rôle essentiel de soutien mécanique au niveau du tronc et des branches (Lucas *et al.*, 2013). Il est composé de trois éléments principaux, à savoir le cambium vasculaire, couche cellulaire génératrice des deux autres, le xylème secondaire constituant l'aubier, et le phloème secondaire formant le liber (Figure 3) (Ruzicka *et al.*, 2015). Ces deux derniers sont les tissus conducteurs. Ils commencent à se différencier à quelques millimètres des apex racinaires et se prolongent tout au long de la plante dans les autres organes tels que la tige, les branches, les feuilles, les fleurs et les fruits (Hopkins, 2003).

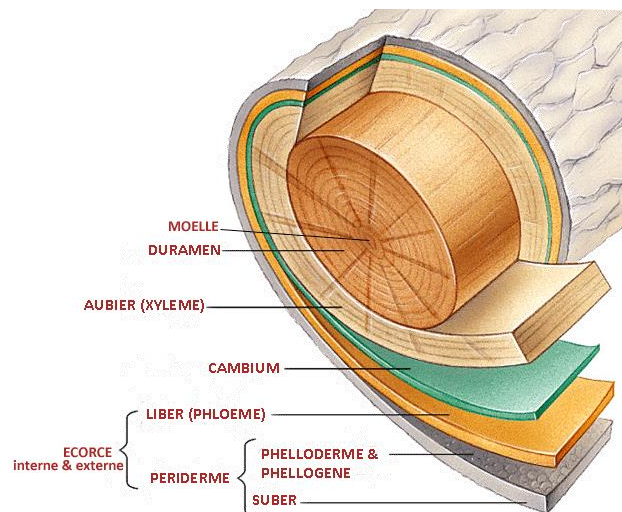


Figure 3 : Structure d'un tronc d'arbre montrant les couches des différents tissus constitutifs. Le xylème est représenté en beige, le phloème en orange et le cambium en vert.

Le liber fait partie de l'écorce avec le périderme. Ce dernier est formé du phellogène ou cambium cortical, qui va produire vers l'extérieur le suber ou liège, formant l'écorce externe subérisée, et vers l'intérieur le phelloderme. Ce dernier est un tissu vivant qui forme avec le phloème l'écorce interne (Fosket, 1994).

Le xylème a pour principale fonction de transporter la sève brute, contenant de l'eau et des éléments minéraux, du sol vers les parties aériennes. Le phloème achemine la sève élaborée, contenant les différentes molécules résultant de la photosynthèse, des feuilles vers les organes en croissance ou de réserve (Figure 4). Lors de l'injection, les substances actives sont positionnées au niveau du xylème pour être emportées par le flux de sève brute.

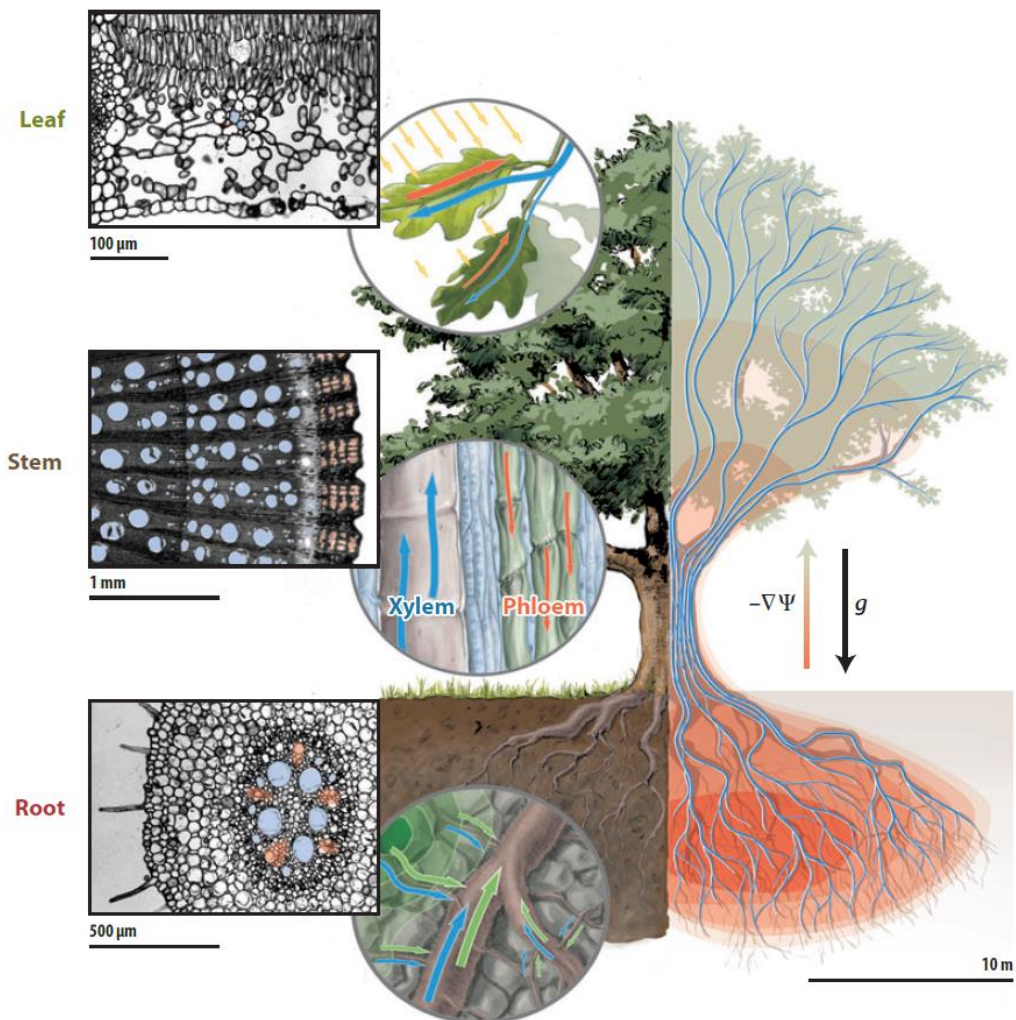


Figure 4 : Vue globale des mécanismes de transport de la sève brute en bleu (dans le xylème) et de la sève élaborée en rouge (dans le phloème) (Stroock *et al.*, 2013).

3.2 Formation des tissus vasculaires

Les cellules de cambium vasculaire se divisent et se différencient vers l'extérieur en cellules précurseurs de phloème et vers l'intérieur en cellules précurseurs de xylème. Plusieurs types cellulaires résultent de la division de ces deux types de cellules initiales (Spicer and Groover, 2010). Les cellules précurseurs de xylème et de phloème vont donner naissance à trois types cellulaires : les cellules conductrices, les fibres et les cellules de parenchyme (Figure 5). Les structures de base du xylème et du phloème sont donc similaires. Néanmoins, l'activité du cambium résulte en la production chaque année d'un cerne xylémien plus épais que le cerne du liber (Chaney, 1986). Le cerne de xylème perdure au cours du temps pour former le duramen.

Les vaisseaux de phloème sont composés de cellules vivantes interconnectées, contrairement au xylème constitué de cellules mortes. Les cellules de phloème, nommées tubes criblés, ont un diamètre compris entre 10 et 40 μm et une longueur de 0,1 à 1 mm. Ils sont associés à des cellules compagnes avec lesquelles ils communiquent par des plasmadesmes. Dans ces tubes, circule la sève élaborée passant d'une cellule à l'autre à travers des cribles. Celle-ci est transportée des sources, les tissus photosynthétiques vers les puits, les tissus en croissance ou les parenchymes de réserve, de manière bidirectionnelle (Hopkins, 2003). Les tissus de réserve peuvent à leur tour être des tissus sources. La vitesse du flux de sève phloémienne est très inférieure à celle de la sève brute.

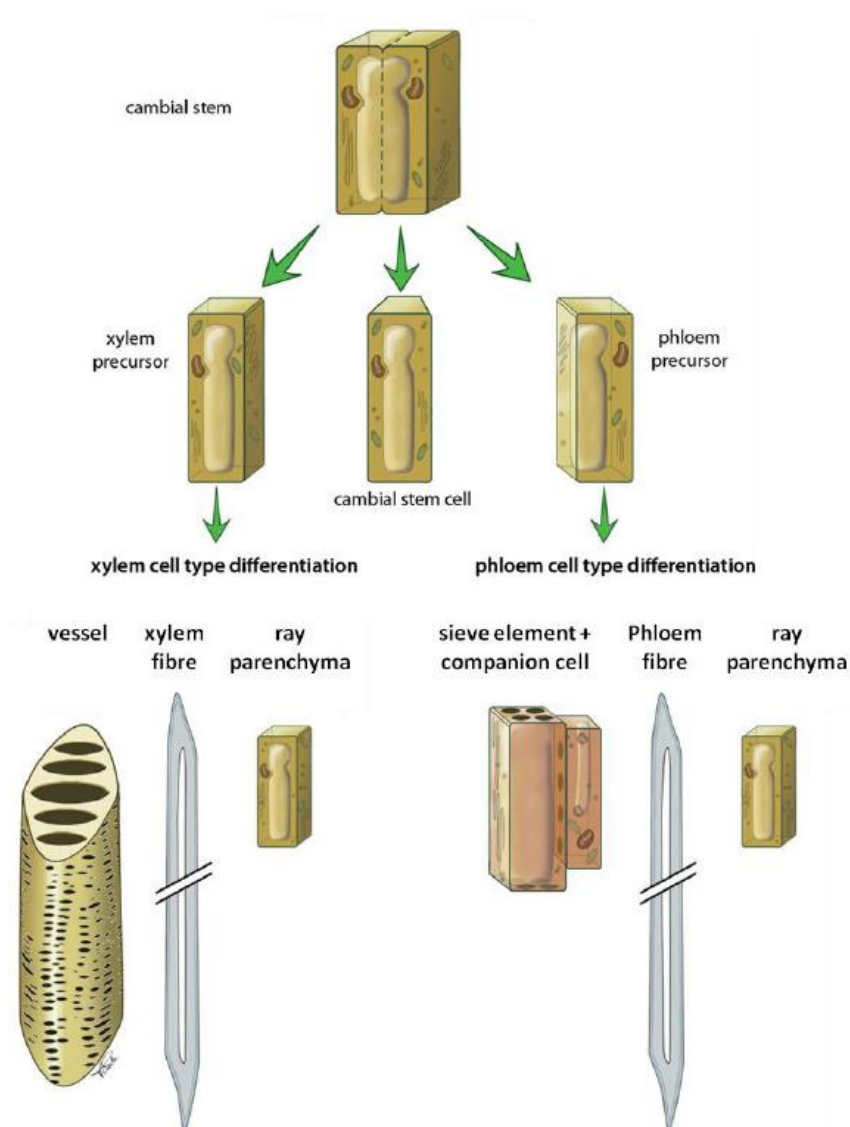


Figure 5 : Formation du xylème et du phloème à partir des cellules cambiales (Ployet, 2017) adaptée de (Schuetz, Smith and Ellis, 2013).

Les vaisseaux de xylème sont constitués d'un empilement de cellules mortes dont le squelette, la paroi cellulaire secondaire, est plus ou moins fortement imprégnée de lignine, un polymère polyphénolique, qui confère de la rigidité à ces cellules. Deux types d'éléments vasculaires peuvent cohabiter : des trachéides et des vaisseaux. Le diamètre des vaisseaux peut être compris entre 10 et 500 μm selon les espèces (Tyree and Zimmermann, 2002) et la sève brute passe d'un vaisseau à l'autre par les ponctuations, des trous dans le squelette lignifié.

3.3 Le xylème : structure et fonction

De manière générale, le bois ou xylème secondaire est constitué d'éléments trachéiformes ou cellules conductrices, de fibres ligneuses (rôle de soutien) et de cellules parenchymateuses (Figure 5) (Hopkins, 2003).

- Les fibres sont des cellules allongées dont les parois secondaires sont très épaisses. Elles ont un rôle de soutien de la plante.
- Les cellules de parenchyme assurent essentiellement le stockage de réserves et le transfert latéral des solutés.
- Les cellules conductrices regroupent les vaisseaux et les trachéïdes. Elles forment un réseau de cellules mortes dépourvues de protoplasme.
 - Les trachéïdes sont de cellules étroites dont le diamètre varie de 10 à 50 μm et qui mesurent généralement moins de 1 cm de long. Elles ont une structure tubulaire avec des extrémités en biseau qui se chevauchent. Elles possèdent des parois secondaires très épaisses leur conférant aussi une fonction supplémentaire de support.
 - Les vaisseaux sont constitués de cellules cylindriques plus ou moins larges qui, agencées bout à bout, forment de longues structures tubulaires. Les parois des extrémités des vaisseaux sont perforées, laissant passer la sève brute. Leur taille est variable mais ils sont généralement plus longs que les trachéïdes. Les parois des vaisseaux et des trachéïdes sont recouvertes essentiellement de cellulose et de lignine (Hopkins, 2003).

La structure générale du xylème des deux grands groupes, angiosperme (feuillus) et gymnosperme (conifères), diffère (Figure 6). De plus, la proportion et l'arrangement de ces différents constituants est unique pour chaque espèce ligneuse (Chaney, 1986).

La structure des gymnospermes est plus simple et uniforme, le xylème est dit non poreux. Les vaisseaux sont absents et les trachéïdes assurent à elles seules le rôle de conduction et de soutien. Les ponctuations chez les gymnospermes sont aréolées, en forme de bourrelet circulaire, présentant un épaississement pariétal central appelé torus, entouré d'une partie marginale appelée marge au travers de laquelle circule la sève (Hopkins, 2003). Le torus joue un rôle de valve de sécurité. La sève circule dans les trachéïdes de plusieurs cernes, environ sept à dix (Chaney, 1986).

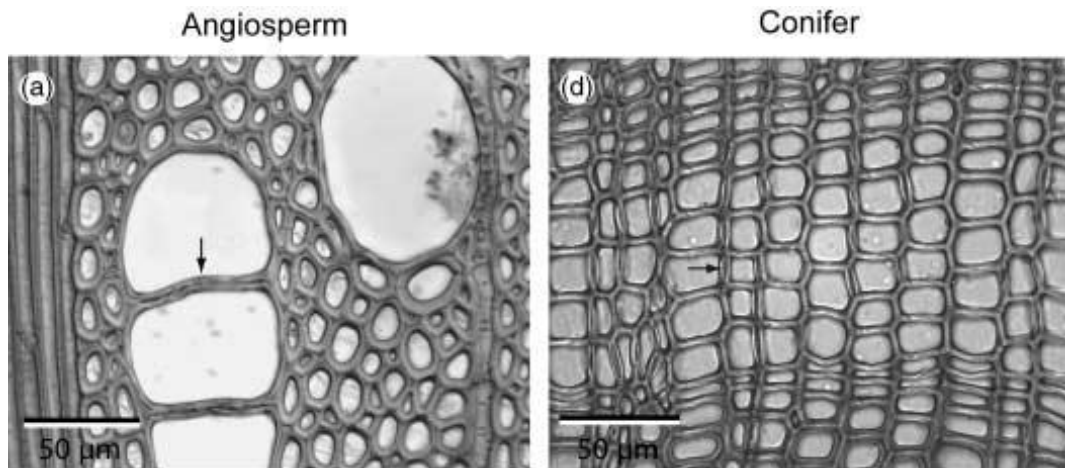


Figure 6 : Structure du xylème des angiospermes et des conifères (Choat, Cobb and Jansen, 2008).

Le xylème des angiospermes est classé en deux catégories : poreux et poreux diffus. Une troisième catégorie constitue le tissu vasculaire des lianes. Chez les espèces poreuses, telles que le châtaignier et l'orme, les vaisseaux de xylème produits tôt dans la saison de croissance sont plus larges que ceux formés plus tardivement dans la saison. Chez les espèces de porosité diffuse, comme le pommier et le peuplier, les vaisseaux sont plus petits que chez les espèces poreuses et le diamètre des vaisseaux ne varie pas au cours de la saison de croissance (Pallardy, 2008). Les plus longs vaisseaux atteignent 1m de long mais la majorité sont beaucoup plus courts, souvent inférieurs à 10 cm (Tyree and Zimmermann, 2002). Les lianes possèdent les vaisseaux les plus longs et de plus gros diamètres. Ils peuvent atteindre jusqu'à 8 m de long (Ewers, 1985).

Chez les arbres poreux, 90% de la sève brute circule dans le cerne de xylème le plus récent. Les arbres à porosité diffuse utilisent les trois derniers cernes pour transporter la sève mais 70% a lieu dans le cerne plus jeune. Lors de l'injection, cette caractéristique est à prendre en compte afin d'injecter à une profondeur adéquate permettant de délivrer les substances actives au niveau des cernes les plus actifs.

L'eau est transportée plus efficacement dans les vaisseaux que dans les trachéides en raison de leur plus grand diamètre, en accord avec l'équation de Poiseuille qui relie le flux hydrique à la taille des vaisseaux.

Le flux Jv d'un liquide dans un conduit est fonction de :

- sa viscosité (η)
- des pertes de charges (ΔP)
- du rayon du conduit (r)

$$Jv = \frac{\Delta P \pi r^4}{8\eta}$$

Cette équation peut s'appliquer au mouvement de la sève dans le xylème.

Le xylème des arbres varie aussi selon le degré de sectorisation et le chemin employé pour monter des racines jusqu'aux feuilles. La montée de sève peut être sectorisée, c'est-à-dire qu'elle suit le chemin avec les connexions vasculaires les plus directes et que la diffusion radiale est faible. A l'inverse, le flux peut être intégré, avec un mouvement latéral plus important (Orians, Smith and Sack, 2005; Zanne, Sharma and Orians, 2006). De plus, la montée de sève peut suivre un chemin direct, ou alors avoir un transfert spiralé, ou encore un flux en zigzag qui dépend de l'agencement longitudinal des faisceaux vasculaires (Chaney, 1986; Orians, Smith and Sack, 2005). Dans le cadre de l'injection dans le tronc des arbres, cette notion de sectorisation est importante car elle conditionnera la diffusion des produits dans le tronc et leur distribution dans le houppier (Orians *et al.*, 2004; Byrne *et al.*, 2012; Aćimović *et al.*, 2014).

4. Fonctionnement hydraulique

Les arbres ont besoin de grandes quantités d'eau pour vivre. Ils ont la capacité de transporter l'eau jusqu'à parfois plus de 100 m de haut. Le moteur principal de la circulation de l'eau dans l'arbre est l'évapotranspiration foliaire. Lorsque l'eau arrive en surface des feuilles, l'énergie solaire lui fournit la quantité d'énergie nécessaire pour passer de l'état liquide à l'état de vapeur si les stomates sont ouverts. Cette évaporation crée une dépression. L'eau, présente dans le xylème, est alors aspirée vers le haut. Cela exploite un mécanisme physique passif pour fournir les grandes quantités d'eau nécessaires aux organes photosynthétiques (Sperry, 2003). Cette aptitude a fasciné nombre de scientifiques qui ont émis différentes théories pouvant l'expliquer. La théorie de la cohésion-tension proposée par Dixon and Joly (1895) est actuellement celle qui est retenue. Un grand nombre de faits expérimentaux sont venus confirmer cette théorie (Steudle, 1995; Cruiziat, Améglio and Cochard, 2001; Tyree and Zimmermann, 2002). La base de cette théorie est

que, pour chaque molécule d'eau évaporée depuis les feuilles, une nouvelle entre dans le flux par les racines grâce aux forces capillaires (Venturas, Sperry and Hacke, 2017). La continuité de la colonne d'eau est possible grâce à la forte cohésion des molécules d'eau entre elles. La sève est ainsi tirée vers le haut par une différence de pression, de force suffisante pour contrer la pesanteur. Elle se trouve donc sous tension, à une pression négative. Au poids de la colonne d'eau s'ajoute des pertes de charge tout au long de la montée créées par les parois du xylème qui vont induire des forces de frottement sur les molécules d'eau, formant une résistance hydraulique au flux (Cochard and Granier, 1999). Le flux hydrique va alors suivre un gradient de potentiel hydrique décroissant du sol vers les feuilles. Chez des arbres de zones tempérées, le potentiel hydrique atteint fréquemment -2 à -3 MPa (Cochard and Granier, 1999). La stabilité de la colonne d'eau est précaire puisqu'elle est soumise à de fortes tensions. Le phénomène de rupture de la colonne d'eau est décrit sous le nom de cavitation, engendrant une embolie des vaisseaux, pouvant être très dommageable pour le fonctionnement de l'arbre (Cruiziat, Améglio and Cochard, 2001).

5. Transfert des produits phytosanitaires dans les plantes

Après l'injection, les molécules se retrouvent dans le flux de sève brute composée essentiellement d'eau. Pour atteindre leurs cibles foliaires, il faut qu'elles soient transportées par le courant de transpiration vers les feuilles. Un des prérequis à ce transport est donc que ces molécules soient solubles dans l'eau. En outre, il faut aussi qu'elles soient suffisamment hydrophiles pour ne pas s'adsorber sur les matières lipophiles, telles que la lignine, présentes sur leur parcours (Riederer, 2004). Toutefois une fois dans les feuilles, elles devront pouvoir diffuser, pour certaines, dans les parenchymes foliaires.

La capacité d'une molécule organique à être transportée dans une plante a été relié principalement à sa lipophilie bien que leur solubilité dans l'eau puisse être un facteur important puisque les molécules sont véhiculées dans la plante dans la sève (Briggs, Bromilow and Evans, 1982; Bromilow and Chamberlain, 1988). L'explication de cette relation est que pour être absorbés ou véhiculés dans la plante, les composés organiques (CO) doivent franchir une certains nombres de barrières lipidiques. Dans les feuilles, les CO doivent traverser la cuticule cireuse à la surface des feuilles pour atteindre les parenchymes foliaires. Dans les racines, les CO doivent plus ou moins traverser le

périderme subérifié mais surtout après avoir pénétré dans le cortex, traverser les cellules de l'endoderme pour atteindre la stèle centrale des racines où se trouvent les tissus conducteurs racinaires, phloème et xylème. Celle-ci est entourée par une couche subéroligneuse relativement étanche, le cadre de Caspary. Les CO doivent donc traverser la membrane cellulaire d'où la nécessité pour eux d'être relativement lipophiles.

La Figure 7 résume la relation entre la lipophilie et l'adsorption ou le transfert dans la plante. Elle est établie avec le coefficient $\log K_{ow}$ qui exprime la lipophilie des CO. Ce coefficient correspond au coefficient de partition entre l'eau et l'octanol, $\log P$ ou $\log K_{ow}$.

D'une part, elle montre la relation exponentielle entre le rapport des concentrations des CO dans les racines et dans l'eau du sol (RCF, root concentration factor) en fonction de leur lipophilie. La fonction exponentielle traduit que l'absorption/adsorption des CO dans les racines est très dépendante de la lipophilie et que l'adsorption est proportionnellement beaucoup plus élevée quand une molécule est très lipophile, $K_{ow} > 3$. D'autre part, elle montre la relation entre le TCSF (Transpiration Stream Concentration Factor) et la lipophilie des molécules. Ce TCSF est le rapport de la concentration de la substance active dans le flux de sève brute à sa concentration dans la solution externe (Briggs, Bromilow and Evans, 1982). Elle permet d'apprécier, en fonction de la lipophilie, la capacité des substances actives à être transportées dans le courant de transpiration (Delrot and Bonnemain, 1991).

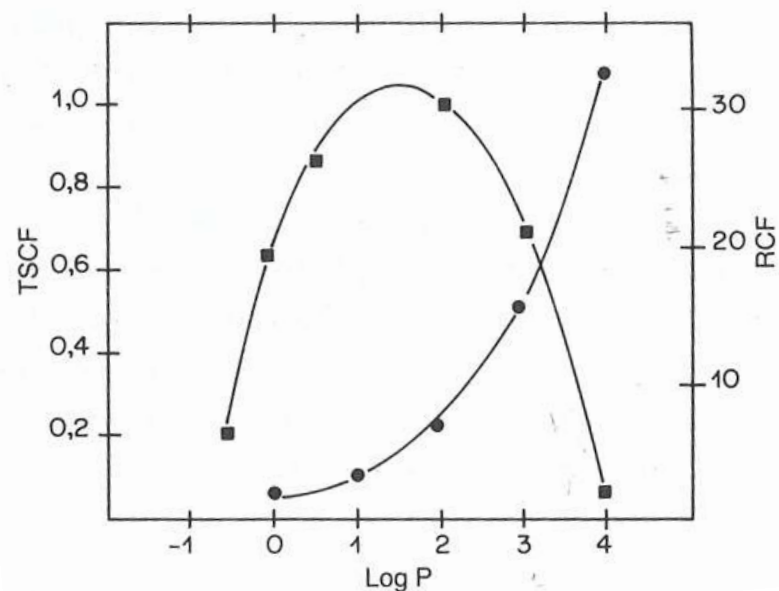


Figure 7 : Evolution du RCF (●) et du TSCF (■) en fonction de la lipophilie des composés organiques neutres (Delrot and Bonnemain, 1991).

Toutefois, le transfert des composés organiques dans les plantes est généralement étudié après application dans le sol (Delrot and Bonnemain, 1991). Le TSCF tient donc compte du passage racinaire. La courbe plus ou moins gaussienne traduit le fait que les CO trop peu lipophiles ne peuvent pénétrer dans la stèle centrale des racines.

A l'inverse, les CO avec un $\log K_{ow}$ trop élevé ($K_{ow} > 4$) sont retenus dans la subérine des assises externes subérisées ou de l'endoderme (couche subéro-ligneuse et membrane plasmique) et n'atteignent donc pas le flux de sève (Aitchison *et al.*, 1994). Seuls, les composés de lipophilie intermédiaire atteignent facilement la sève et peuvent être transportés par celle-ci. Ainsi, il a été démontré que l'optimum de translocation apoplastique (c'est-à-dire hors des cellules vivantes, donc principalement le courant xylémique, mais aussi les espaces intercellulaires) se trouve autour de $\log P = 1,7$ (Figure 7) bien que cela dépende de la série de CO utilisée pour construire le graphique (Delrot and Bonnemain, 1991).

L'injection directement dans le tronc permet ainsi d'éviter la phase d'absorption dans la plante. Les molécules étant directement présentes dans les vaisseaux, seule la phase de transfert par le flux est à considérer. Les molécules avec des $\log K_{ow}$ faibles devraient donc pouvoir être transférées avec la sève brute. En revanche pour les molécules lipophiles, même si elles ne peuvent plus être retenues sur les barrières lipidiques des racines, des phénomènes d'adsorption pourraient avoir lieu sur les parois du xylème, riches en lignine. Une relation linéaire lie le logarithme du coefficient d'adsorption des molécules sur la lignine et le $\log K_{ow}$ (Delrot and Bonnemain, 1991). Par exemple, le bois des conifères a une teneur en lignine plus élevée (25-35%) que celui des feuillus (18-25%). Par conséquent, les molécules lipophiles sont susceptibles d'être plus adsorbées dans le xylème des conifères (Trapp, Miglioranza and Mosbaek, 2001).

D'autre part, les molécules chargées positivement peuvent être retenues sur les charges négatives au niveau des parois des vaisseaux xylémiens. Le transfert de ces molécules ionisées est aussi influencé par leur constante de dissociation, pK_a qui détermine leur capacité à traverser les biomembranes (Sur and Stork, 2003). Le xylème possède un pH d'environ 5 alors que celui du phloème est de 8. Ces différences de pH n'influencent pas la distribution des composés neutres, non ionisés, mais influencent fortement la distribution des composés ionisés (Inoue, Chamberlain and Bromilow, 1998). Les acides faibles avec des pK_a en dessous de 5 et de faibles $\log K_{ow}$ (entre 1 et 2,5), vont ainsi

s'accumuler dans le phloème. La fraction non ionisée diffuse à travers les membranes du phloème et restent ensuite piégée dans la sève élaborée car le pH plus élevé de ce compartiment déplace l'équilibre vers la forme ionisée de la molécule qui ne peut plus franchir la membrane. Les molécules neutres peuvent diffuser librement entre les compartiments mais le flux xylémique, 50 à 100 fois supérieur à celui du phloème, va majoritairement emporter ces molécules (Sur and Stork, 2003). De manière générale, la migration dans le flux de transpiration sera favorisée par un débit de sève important (Delrot and Bonnemain, 1991).

6. Petit précis de pharmacocinétique

L'emploi de molécules chimiques, synthétiques ou non, pour soigner les plantes nécessite comme en médecine humaine ou vétérinaire, de connaître à la fois les effets des molécules sur l'organisme et le devenir de ces molécules dans l'organisme traité.

En pharmacologie humaine ou animale, on distingue ainsi la pharmacodynamie et la pharmacocinétique (PK). La pharmacodynamie étudie l'impact sur l'organisme traité des molécules médicamenteuses, les principes actifs, en fonction du temps. Cela peut être un effet thérapeutique (ce qui est recherché) ou un effet toxique (ce qui doit être évité). Afin de bien comprendre l'évolution de ces effets, il est nécessaire aussi de bien connaître le devenir du principe actif dans l'organisme. C'est le rôle des études de pharmacocinétique qui sont réalisées en parallèle des études de pharmacodynamie (Figure 8). Dans la suite de ce chapitre, nous parlerons de pharmacologie quand il sera fait référence aux études de médicaments chez l'homme ou l'animal, et le préfixe « phyto » sera adjoint quand il sera fait référence aux produits phytosanitaires.

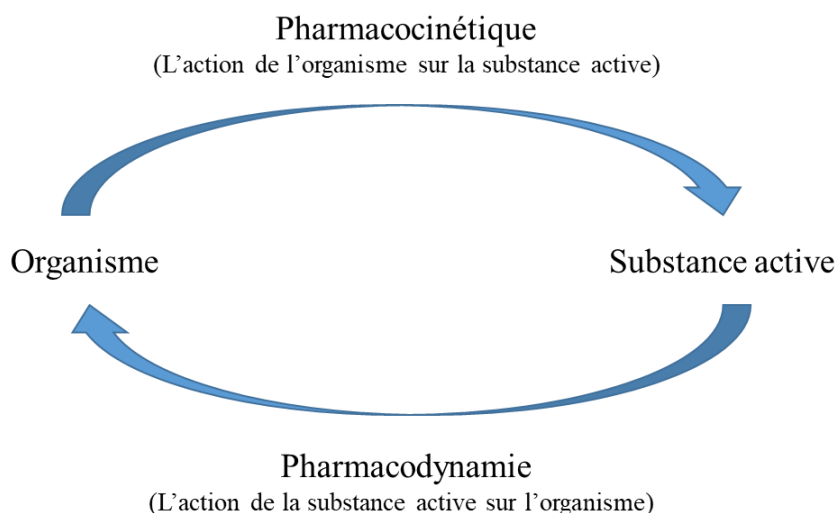


Figure 8 : Relation entre la pharmacodynamie d'un principe actif ou d'une substance active et sa pharmacocinétique. Relation entre la pharmacodynamie d'un principe actif ou d'une substance active et sa pharmacocinétique.

La pharmacocinétique étudie donc le devenir des principes actifs des médicaments dans les organismes. Ces études sont aussi appelées études ADME pour Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion. La pharmacocinétique permet ensuite de relier l'évolution des concentrations en principe actif dans un organisme avec l'évolution de ses effets, de l'apparition de l'effet thérapeutique souhaité jusqu'à la dissipation de cet effet ou à l'apparition d'éventuels syndromes toxiques. Elle participe complètement à l'étude des substances actives médicamenteuses. En tant que telle, cette discipline n'est que succinctement utilisée en phyto-pharmacie où, à notre connaissance, seuls quelques paramètres de base tels que les concentrations maximales ou les constantes d'élimination sont déterminées. Nous souhaitons, dans cette thèse, appliquer à nos résultats de distribution des substances actives dans les arbres, les principes de l'analyse pharmacocinétique telle qu'elle est pratiquée lors de l'étude de médicaments. Nous introduirons ci-après les différentes notions de pharmacocinétique qui seront utilisées dans cette étude. Ce chapitre est basé sur les principes décrits dans les ouvrages de Chatelut (2018) et de Labaune (1987). Pour plus d'informations, le lecteur est invité à se reporter à ces ouvrages. Dans un premier temps nous présenterons ces notions du point de vue de la pharmacologie humaine ou animale, puis dans une seconde partie nous présenterons une application à un modèle végétal.

6.1 Etude pharmacocinétique

La base d'une étude pharmacocinétique est de déterminer l'évolution des concentrations en principe actif dans un organisme au cours du temps. En général, la mesure des concentrations est réalisée dans un compartiment dit central, le compartiment sanguin. Ces concentrations peuvent, en plus, être déterminées dans des compartiments périphériques tels que le foie ou les muscles, par exemple. La courbe qui est établie à partir de ces concentrations en fonction du temps présente généralement deux phases : une phase d'augmentation des concentrations due à l'absorption du principe actif dans l'organisme, et une phase de décroissance en lien avec l'élimination du principe actif du compartiment de mesure.

De la courbe d'évolution des concentrations en fonctions du temps $[s.a.] = f(t)$, (Figure 9), différents paramètres pharmacocinétiques vont être déterminés. Sur cette courbe peuvent être superposé un seuil d'efficacité, c'est-à-dire la concentration minimale efficace, et un seuil de toxicité, la concentration minimale toxique. La connaissance approfondie de la pharmacocinétique va permettre en parallèle de la pharmacodynamie, de déterminer les posologies efficaces (dose et fréquence de traitement) ou les modes d'administration du principe actif les plus pertinents.

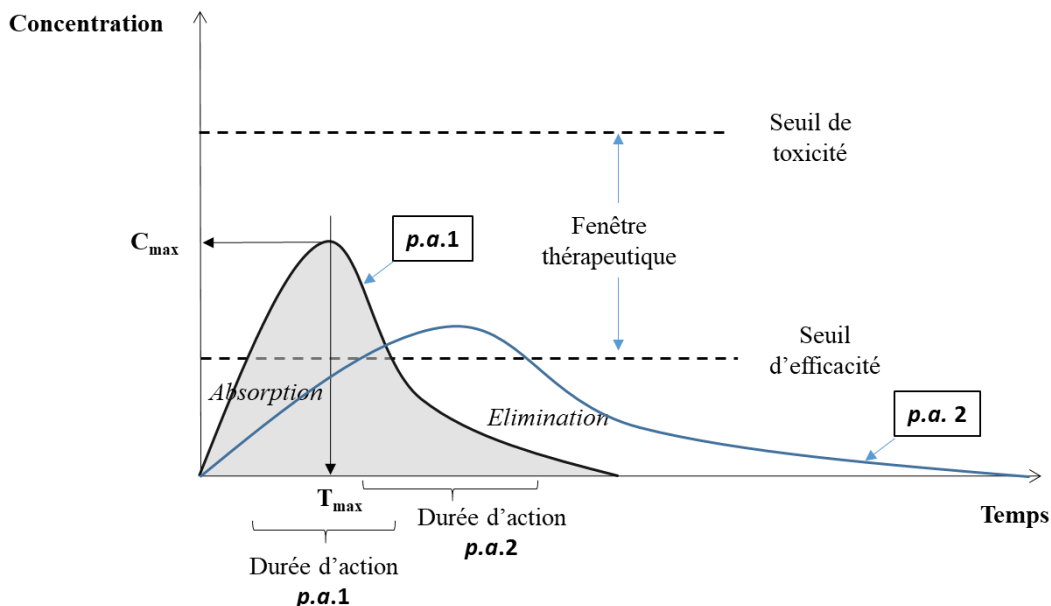


Figure 9 : Pharmacocinétiques plasmatiques chez l'animal d'un même principe actif (p.a.), mais sous deux formes galéniques différentes p.a.1 et p.a.2, après administration extra-vasculaire d'une même dose, montrant l'intérêt des études pharmacocinétiques. Leurs cinétiques diffèrent essentiellement par un processus d'absorption plus rapide pour p.a.1. ($t_{max} \text{ pa1} < t_{max} \text{ pa2}$) mais une C_{max} plus faible pour p.a.2. malgré une aire sous la courbe (AUC) plus grande. De ce fait, les conséquences pharmacologiques seront différentes.

6.1.1 L'absorption

C'est la phase durant laquelle la molécule est transférée du site d'administration au compartiment central. Durant cette phase, une partie du principe actif peut ne pas être transféré vers le compartiment central et ainsi n'être pas disponible pour agir. Cela peut être un point limitant de l'utilisation d'une forme galénique (préparation d'un principe actif sous la forme duquel est administré un médicament). Cette phase d'absorption est inexistante lorsque le principe actif est injecté sous forme d'un bolus (dose administrée d'un coup) directement dans le compartiment central.

La vitesse à laquelle le principe actif est absorbé conditionne son efficacité et dépend de la forme galénique administrée. Cette vitesse d'absorption peut être évaluée graphiquement par le temps (T_{\max}) nécessaire pour atteindre la concentration maximale, C_{\max} , dans le compartiment central. A la valeur de C_{\max} , les deux processus d'absorption et d'élimination sont équivalents. Ce n'est cependant qu'une approximation puisque dès l'administration les processus d'élimination entrent en jeu. La vitesse réelle, caractérisée par la constante d'absorption k_a est la pente à l'origine de la courbe au temps 0. Du fait de la présence concomitante de l'élimination, il est difficile de déterminer graphiquement cette constante k_a .

Comme vu plus haut, une fraction de la posologie de la molécule peut ne pas atteindre le compartiment central après l'absorption. On définit ainsi la **biodisponibilité** d'une forme galénique donnée comme le rapport de la quantité de molécule absorbée par l'organisme à la dose administrée. Cette fraction va dépendre de l'individu mais surtout de la forme galénique sous laquelle est administré le médicament. Elle ne permet cependant pas la comparaison de l'efficacité de ces différentes formes. En effet, à biodisponibilité égale, deux formes galéniques peuvent ne pas produire les mêmes concentrations dans l'organisme et donc un effet équivalent si les vitesses d'adsorption sont différentes (Figure 9).

6.1.2 Distribution et élimination (métabolisme et excrétion).

La disparition d'une molécule du compartiment central est un processus qui recouvre en fait plusieurs processus différents : (i) le transfert du principe actif du compartiment central vers les autres tissus ou organes de l'organisme, la distribution ; (ii) la dégradation de la molécule dans l'organisme, le métabolisme ; (iii) chez les animaux et l'homme

l'exportation hors de l'organisme du principe actif par excrétion urinaire ou fécale principalement, l'élimination.

L'élimination co-existe avec l'absorption jusqu'à l'absorption complète de la dose administrée. Après le T_{max} , le processus d'élimination prend le dessus sur l'absorption. Pour des temps longs, la dose résiduelle absorbable devient négligeable. De ce fait, la phase de décroissance du principe actif dans le compartiment central peut être considéré comme une phase d'élimination pure, et la pente terminale de la courbe permet de déterminer une constante d'élimination K_e .

6.2 L'analyse pharmacocinétique

Quand le médicament est directement injecté dans le compartiment central, la cinétique d'une molécule dans celui-ci répond à l'équation générale :

$$C = A \cdot e^{-K t}$$

Où C, concentration dans le compartiment central ; A, la concentration maximale dans le compartiment ; et K, la vitesse d'élimination.

L'évolution des concentrations ne va dépendre que de l'élimination du principe actif du compartiment sanguin. De cette cinétique, différents paramètres pharmacocinétiques peuvent être calculés ou déduits : l'aire sous la courbe, ASC ou AUC ; les constantes d'absorption et d'élimination, k_a et k_e ; la biodisponibilité F ; la clairance, Cl ; le volume de distribution, Vd ; la demi-vie du principe actif, $t_{1/2}$ et le temps de résidence moyen dans le compartiment central, MRT (mean residence time).

Pour une molécule donnée, tous ces paramètres vont dépendre de l'organisme considéré, l'homme ou le rat par exemple, de la forme galénique utilisée (suspension buvable, cachet...), de la dose et de la voie d'administration, directe dans le compartiment central (voie intraveineuse (*i.v.*) ou indirecte (voie dermique ou percutanée *pc*, par exemple ou voie orale ou *per os*, *po*).

- Aire sous la courbe (AUC) :

L'aire sous la courbe (ASC) ou selon l'abréviation anglaise AUC (Area Under the Curve) est l'intégration de la courbe d'évolution de la concentration du principe actif dans le compartiment central en fonction du temps : $AUC = \int_0^{\infty} C(dt)$.

- Biodisponibilité, F :

Elle est calculée par le rapport de l'AUC à une AUC de référence pour ce principe actif. En pharmacologie, cette AUC de référence est l'AUC du principe actif lorsque celui-ci est injecté en bolus dans le compartiment central, le compartiment sanguin (injection intraveineuse, *iv*), 100% de la molécule est disponible. F est alors égale à 1 et correspond à la biodisponibilité absolue. Pour toute autre voie d'administration, la biodisponibilité sera au plus égale à 1.

Précision : si les doses administrées dans les deux compartiments sont différentes, les AUC doivent être reportées à leur posologie.

$$\text{Alors, } F = \text{AUC}_x \cdot \text{Do}_{iv} / \text{AUC}_{iv} \cdot \text{Do}_x,$$

où x fait référence au compartiment test et Do_x et Do_{iv} sont respectivement la posologie dans le compartiment test et la posologie intraveineuse de référence.

- Clairance, Cl :

C'est le volume du compartiment central (de sang) complètement épuré en substance active par unité de temps. Elle est calculée à partir de la PK du compartiment central, la PK_{iv} .

$$\text{Cl} = \text{Do}_{iv} / \text{AUC}_{iv \text{ totale}}$$

Elle représente la capacité de l'organisme à éliminer le principe actif. Il faut noter que la dose est exprimée en unité de masse ou de molarité par kg de masse corporelle.

- Volume de distribution, Vd :

C'est le volume tissulaire hypothétique qu'occuperait une substance si elle était dans les tissus périphériques à la même concentration que dans le compartiment central. Plus ce volume est élevé, mieux la substance est distribuée dans l'organisme.

- Demi-vie, $T_{1/2}$:

La demi-vie est une indication de la persistance dans l'organisme de la posologie administrée :

$$T_{1/2} = \ln 2 / k_e.$$

- Temps de résidence moyen, MRT :

C'est le temps moyen pendant lequel une molécule de principe actif reste dans le compartiment central. Ce temps est déterminé par le rapport entre AUMC et AUC. L'AUMC est l'aire sous la courbe au moment premier,

$$AUMC = \int_0^{\infty} t \cdot C(dt)$$

6.3 Modèle Pharmacocinétique

Pour effectuer les analyses pharmacocinétiques, il est nécessaire de déterminer quel modèle d'analyse doit être utilisé. Par défaut, une analyse dite non-compartmentale peut toujours être appliquée. Sinon, une analyse compartimentale à 1 ou plusieurs compartiments est effectuée.

6.3.1 Analyse non-compartmentale

Dans une analyse non-compartmentale, l'AUC est calculée par la méthode linéaire des trapèzes. C'est la somme des surfaces sous la courbe entre deux temps de prélèvements consécutifs, t_i et t_{i+1} : $AUC_{ti}^{ti+1} = \frac{(Ct + Ct+1)}{2} \times (T_{i+1} - T_i)$.

$$AUC_0^{t_{fin}} = \sum_{t=0}^{t_{fin}} AUC_{ti}^{ti+1},$$

où T_{fin} est la dernière concentration mesurée.

Pour calculer l'AUC_{totale}, il faut déterminer l'AUC finale de T_{fin} à l'infini :

$$AUC_0^{\infty} = C_{t_{fin}}/k_e.$$

$$L'AUC_{totale} \text{ est alors : } AUC_{tot} = AUC_0^{t_{fin}} + AUC_0^{\infty}.$$

k_e est déterminée par la pente de la partie terminale de la cinétique (les 3 à 4 derniers points de la courbe). Cela est réalisé après linéarisation semi logarithmique de la cinétique.

L'analyse non-compartmentale est une approche descriptive des phénomènes. Les paramètres pharmacocinétiques sont directement déduits des points expérimentaux (C_{max} , T_{max}) ou obtenus par l'intermédiaire d'équations mathématiques simples.

L'AUC et l'AUMC ou le MRT peuvent aisément être calculés par cette méthode mais le modèle non-compartmental ne permet pas de déterminer ou de prédire d'autres types de posologie et des modèles plus complexes doivent être utilisés. Par exemple, le modèle non-compartmental ne permet pas d'accéder à la constante d'absorption.

6.3.2 Analyse compartimentale

Pour obtenir une description plus dynamique des phénomènes, il est nécessaire d'utiliser une analyse pharmacocinétique compartimentale, où chaque compartiment peut représenter un ou plusieurs tissus ou organes particuliers avec le compartiment sanguin comme compartiment central où arrive le principe actif et d'où il part vers les autres organes. Les courbes cinétiques sont bien sûr les mêmes mais la façon de les analyser est différente. Elle utilise des modèles mathématiques plus complexes et permet d'accéder à des valeurs des différents paramètres plus justes. Elle permet, notamment une bonne déconvolution entre les constantes d'élimination et d'absorption.

La Figure 10 montre l'exemple d'un modèle mono-compartmentale après absorption orale d'un médicament.

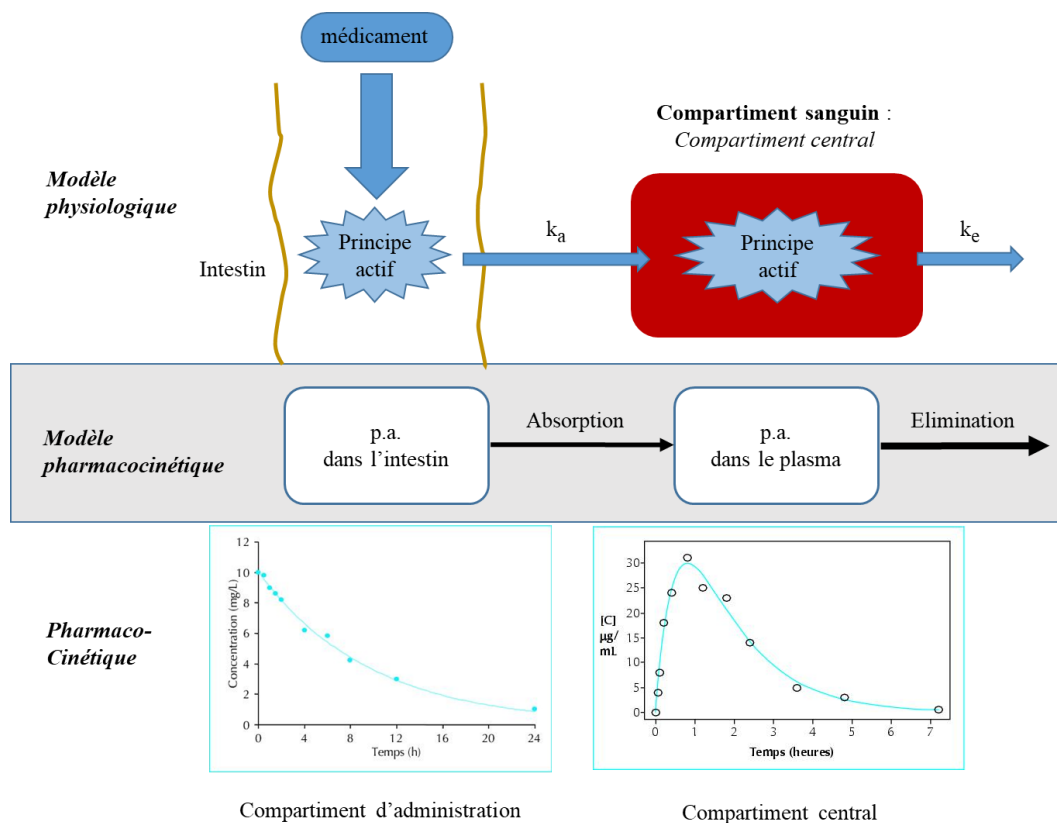


Figure 10 : Modèle mono-compartmental après administration orale d'un médicament sous forme d'un bolus.

6.4 La phyto-pharmacologie

Généralement utilisée pour l'étude des principes actifs des médicaments, une seule publication, à notre connaissance actuelle, fait une application formelle de l'analyse pharmacocinétique dans l'analyse du transfert de molécules organiques dans les plantes.

Dans cette publication, Chen *et al.* (2017) ont utilisé un modèle non-compartmental après administration par perfusion (administration continue) pour analyser, chez divers végétaux, la cinétique de deux antibiotiques contaminants le sol. Dans cette analyse, ils ont considéré les racines comme le compartiment central de la plante et le feuillage comme un compartiment périphérique et que l'administration était une perfusion car la concentration dans le sol était relativement constante.

Cette analyse pharmacocinétique leur a permis ainsi de paramétrer le devenir de ces antibiotiques dans deux plantes légumières et de comparer avec des paramètres fiables l'interaction des différentes plantes sur le devenir de chacun des antibiotiques.

La conclusion de leur article était « *L'analyse phyto-pharmacocinétique pourrait être un nouveau domaine qui mérite d'être développé pour l'évaluation des médicaments vétérinaires dans les plantes* ». Le contexte particulier de cette étude était l'évaluation sanitaire des légumes cultivés sur des sols après apport de lisiers contenant des résidus de médicaments vétérinaires.

Conclusion :

Nous pensons que cette analyse phyto-pharmacologique peut être élargie à l'ensemble des composés organiques absorbés par les plantes, quelques soient leurs destinations d'utilisation, et quel que soit le type de plantes ou de traitements. En premier, nous l'appliqueront à nos résultats obtenus après injection dans le tronc de différents produits phytosanitaires.

7. Objectifs de la thèse et questions de recherche

Cette synthèse bibliographique a mis en avant l'intérêt de la méthode d'injection dans le tronc des arbres pour lutter contre les bioagresseurs à la place des méthodes conventionnelles, telles que la pulvérisation. Néanmoins, cette méthode est de temps en temps décriée à cause de la blessure parfois importante qu'elle cause à l'arbre et des résultats d'efficacité assez variables. En production fruitière, il y a aussi des réticences à son utilisation liées à la méconnaissance du risque de transfert de résidus dans les fruits ou dans les fleurs. Cette méthode est cependant assez répandue aux Etats-Unis et dans d'autres pays d'Europe mais n'est pas encore utilisée en France. Le but du projet PREAMISSE, dans lequel était intégrée cette thèse, était entre autres d'évaluer cette méthode de traitement. Il visait aussi à mettre au point une technique de micro-injection, délivrant un faible volume de préparation phytosanitaire (1 ml) avec un matériel type seringue sans pré-perçage du tronc, permettant de traiter efficacement les arbres contre les bioagresseurs. Un autre objectif était d'apporter des éléments scientifiques nécessaires à la compréhension des phénomènes en jeu dans cette méthode. Quatre espèces ligneuses ont été étudiées dans ce projet : le pommier, le châtaignier, le pin et la vigne. Dans ce contexte, je me suis intéressée à différents éléments intervenant lors de l'injection et durant le transfert des substances actives vers les cibles foliaires, éléments pouvant avoir un impact sur la réussite du traitement des arbres par cette méthode (Figure 11). Les points identifiés étaient dans l'ordre du déroulement du processus de traitement : l'impact de l'injection sur les tissus du tronc au niveau du site d'injection, le transfert des substances actives ainsi que leur distribution temporelle et spatiale dans le houppier et enfin l'efficacité de certaines molécules contre un bioagresseur particulier.

De ces différents points, quatre objectifs de ma thèse ont émergés :

- Evaluer l'impact sanitaire de la méthode de micro-injection sur l'arbre¹ et en particulier de la blessure causée au tronc ;
- Etudier la distribution temporelle et spatiale des produits phytosanitaires (PPP) dans les arbres après injection et la persistance du traitement ;

¹ Ces essais ont été réalisés sur la vigne et le pommier. Par soucis de clarté le terme générique arbre sera employé pour les différentes espèces ligneuses. Lorsque des points particuliers relatifs à la vigne seront abordés, nous le spécifierons.

- Déterminer les paramètres qui contrôlent leur transfert dans les différentes essences d'arbres :
 - o soit des paramètres anatomiques et physiologiques des arbres,
 - o Soit des paramètres physico-chimiques des substances actives ;
- Tester l'efficacité de substances actives antifongiques utilisable par injection.

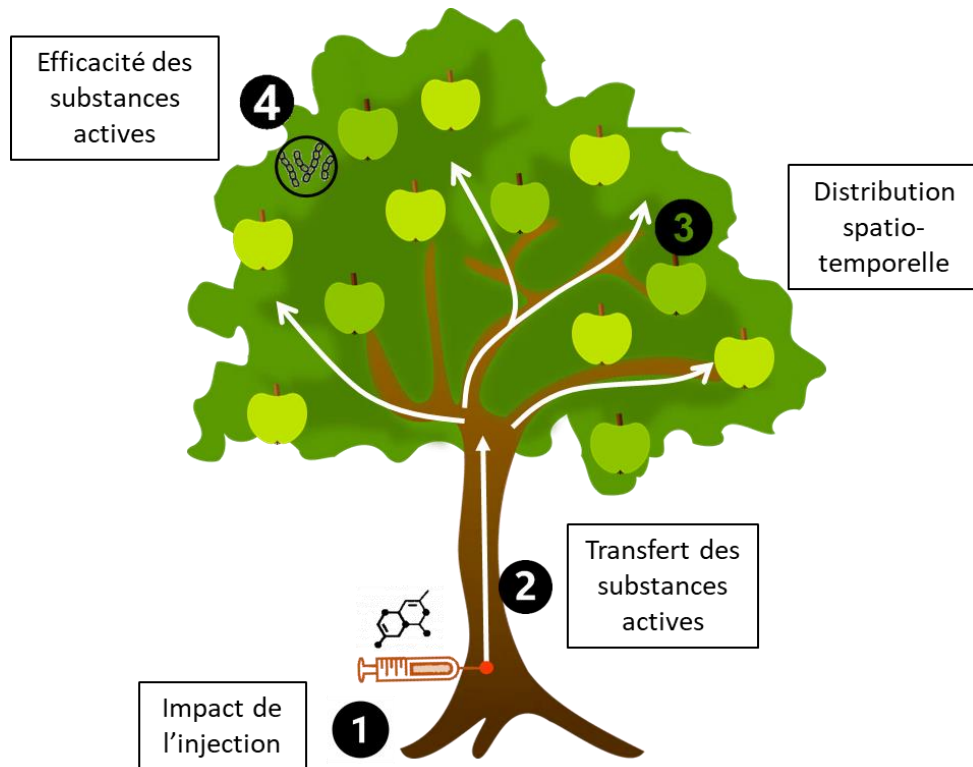


Figure 11 : Représentation schématique des différents objectifs en lien avec les étapes survenant après l'injection.

Sur la base de ces quatre objectifs, chacun articulé autour d'un chapitre, différentes questions de recherche ont été posées.

Dans un premier chapitre, **chapitre 2**, j'ai voulu répondre aux suivantes :

- Quelle blessure est occasionnée au tronc lors d'une micro-injection ? Quel est l'impact sur la santé de l'arbre et sur les tissus au niveau du point d'injection ?
- Quelles sont les différentes réactions que l'arbre met en place en réponse à cette blessure et dans quels délais ?
- Est-ce que la résilience de la blessure rend la méthode de micro-injection durable ?

Avant de pouvoir utiliser cette méthode, il était primordial de savoir si elle n'avait pas d'impact négatif sur la santé de l'arbre et si la réponse de l'arbre n'était pas un frein à la pérennisation de cette méthode, d'une part pour une utilisation d'année en année sur les mêmes arbres, d'autre part pour sa généralisation à toutes les essences.

Pour cela, j'ai développé une méthode d'observation macroscopique et microscopique appliquée directement sur des sections de troncs (sans nécessité de coupe fine).

Ensuite, dans le **chapitre 3**, j'ai souhaité répondre à des questions concernant le devenir des substances actives lors d'un traitement sur des arbres en conditions d'exploitation :

- Quelle est la cinétique de distribution dans le temps des substances actives et comment elles se répartissaient dans le feuillage en fonction de l'anatomie de l'arbre ou des caractéristiques des molécules ?
- Est-ce que ce traitement par voie systémique entraînait un transfert de résidus vers les fruits ?

J'ai donc étudié la distribution spatiale de trois substances actives, l'imidaclopride, le pyriméthanil et le difénoconazole, au cours du temps dans les feuilles et les fruits après leur micro-injection sur des arbres d'un verger de pommiers. En effet, pour qu'un traitement soit efficace, les molécules doivent être réparties de manière homogène dans l'organe cible (ici, le feuillage) et entrer en contact avec le ravageur au moment optimal et avec une persistance suffisante pour couvrir la période de présence du bioagresseur, tout en évitant la contamination des fruits et des fleurs. Des fleurs, pour éviter, dans le cas d'insecticide, de porter atteinte à la faune auxiliaire, ou des fruits par des concentrations en résidus au-delà des limites réglementaires, les limites maximales de résidus (LMR) et constituer ainsi un risque pour le consommateur préjudiciable à cette méthode.

Pour faire suite aux résultats obtenus lors de ces essais au champ, j'ai souhaité répondre dans le **chapitre 4** aux questions suivantes :

- Quelle est l'influence des caractéristiques des molécules sur leur transfert ?
- Comment la structure de l'arbre influence-t-elle ce transfert ?

Des expérimentations ont donc été réalisées en conditions contrôlées afin d'expliquer divers phénomènes observés en conditions naturelles. Pour cela, nous avons testé, par exemple, l'influence de la lipophilie des substances actives sur leur transfert dans des

branches excisées de différentes espèces, en privilégiant toutefois les études sur le pommier. La comparaison de différentes espèces devait permettre d'anticiper le rôle de la structure particulière de certaines essences sur leur capacité à transférer plus ou moins efficacement les substances actives.

Enfin dans le **chapitre 5**, je présente le travail réalisé en Italie à l'Université de Padoue, sur l'étude de l'efficacité de différentes substances actives fongicides, le thiabendazole (une molécule de référence), l'allicine et les nanoparticules d'argent sur plusieurs souches de champignon pathogènes des pommiers, de la vigne, du pin et de l'olivier, dans le but de leur application par injection. Dans ce chapitre les questions de recherche auxquelles j'ai tenté de répondre sont :

- A quelle dose ces produits sont-ils efficaces contre les champignons testés ?
- Est-ce que des produits alternatifs aux fongicides chimiques conventionnels peuvent être aussi efficaces ?

A l'issue de ces quatre chapitres, les principaux résultats acquis dans le cadre de ces études sont discutés au regard des objectifs énoncés précédemment. Les perspectives de recherche sont aussi exposées (**Chapitre 6**).

CHAPITRE 2 : IMPACT DE L'INJECTION SUR LA SANTE DE L'ARBRE ET RESILIENCE DE LA BLESSURE D'INJECTION

1. Introduction

Le traitement par injection dans le tronc consiste à positionner les produits phytosanitaires dans l'aubier d'où ils sont ensuite transférés par le flux de sève (Fettig, Grosman and Munson, 2013). Il est donc nécessaire de perforer les plans tissulaires les plus externes pour accéder aux vaisseaux xylémiens, créant ainsi une blessure à l'arbre (Shigo, Money and Dodds, 1977; Aćimović *et al.*, 2016). La plupart des méthodes d'injection nécessitent de faire un trou avec une perceuse avant d'injecter, provoquant ainsi un échauffement et une ablation d'écorce et de bois (Aćimović *et al.*, 2016). Comme cité précédemment dans le chapitre 1, il n'existe que deux méthodes d'injection sans perçage, Bite® (P.A.N srl, Padova, Italy) et Wedgle® (ArborSystems LLC, NE, USA). La blessure provoquée par l'injection peut avoir des conséquences sur la santé de l'arbre. Lors de l'injection, des fissures ou des décollements de l'écorce peuvent apparaître ainsi que des écoulements de sève (Perry *et al.*, 1991; Aćimović *et al.*, 2016). A l'intérieur du tronc, des pourritures, des dommages au cambium et des colorations du bois peuvent être observés (Shigo, Money and Dodds, 1977; Dujesiefken *et al.*, 2005). De plus, le port d'injection peut être une porte d'entrée pour les pathogènes, pouvant ainsi mettre l'intégrité de l'arbre en péril (Perry *et al.*, 1991; Ferracini and Alma, 2008; Aćimović *et al.*, 2016). Il est donc essentiel de minimiser la blessure causée à l'arbre et d'obtenir une fermeture rapide du trou. Par ailleurs, il est souvent requis de faire plusieurs ports d'injection pour traiter un arbre, opérations qui peuvent être renouvelées tous les ans, engendrant des atteintes répétées (Aćimović *et al.*, 2014). Pour que la méthode soit viable dans le temps, il faut que le volume de bois impacté soit limité et que l'arbre reprenne rapidement sa croissance normale. Dans ce projet, la méthode employée ne nécessite pas de perçage préalable, c'est l'aiguille qui perce l'écorce et le bois au moment de l'injection. De plus, le diamètre de l'aiguille est faible (2 mm). Vérifier que l'injection n'a pas d'impact négatif sur la santé de l'arbre et que la résilience de la blessure d'injection est rapide est donc un prérequis à l'utilisation de cette méthode.

La cicatrisation des blessures mécaniques ou fongiques a été décrite par Shigo (1984), qui a modélisé la réaction de l'arbre par le modèle de CODIT (Compartmentalization Of Decay In Trees). Ce modèle de compartimentation tente essentiellement d'expliquer la distribution spatiale de la coloration et de la décomposition par la mise en place de barrières physiques (tyloses et couches subérisées) et chimiques à l'entrée de pathogènes, permettant

de limiter leur infestation/croissance. Il décrit ainsi quatre types de barrières ou parois. La paroi 1 est formée par l'occlusion des éléments vasculaires par des thylls ou par des dépôts de composés polyphénoliques incluant par exemple des tannins hydrolysables, des proanthocyanidines et des glycosides flavonoïdes (Eyles, Davies and Mohammed, 2003). La deuxième paroi est constituée par la lignification des dernières cellules d'un cerne. Le dépôt d'éléments chimiques dans les rayons parenchymateux forme la paroi 3. Enfin, la paroi 4, appelée zone de barrière, est la protection la plus forte du modèle et est formée par le cambium après la blessure pour séparer le bois présent avant la blessure du bois formé après la blessure. Les processus de coloration associés à la blessure s'arrêtent à la zone barrière. Cette zone est caractérisée par une grande quantité de parenchyme axial et peu d'éléments conducteurs. La résistance de la zone barrière peut être attribuée à la subérisation qui étanchéifie cette zone de protection (Torelli, Krizaj and Oven, 1994). Depuis, d'autres études ont confirmé le modèle CODIT et apporté des informations supplémentaires sur la chronologie des réactions et la constitution chimique des différentes parois (Biggs, 1985; Vek, Oven and Humar, 2013; Smith, 2015; Morris *et al.*, 2016).

Pareillement, des études se sont intéressées aux blessures d'injection mais les observations ont toujours été réalisées à l'œil nu. En effet, la plupart des études consistaient uniquement à observer les dimensions de la blessure et sa fermeture en faisant des mesures sur l'écorce d'arbres sur pied (Biggs, 1985; Neely, 1988; Dujesiefken and Rhaesa, 1999; Morris *et al.*, 2016). Or ces observations ne permettent pas d'évaluer l'état des différents tissus internes ni la réelle fermeture du trou. Seules peu d'études ont fait des observations internes en coupant les arbres au niveau du point d'injection. Celles-ci ont toujours été effectuées à l'œil nu, ce qui ne donne pas non plus d'informations sur l'état des tissus conducteurs de sève (Shigo, Money and Dodds, 1977; Shigo, Shortle and Garrett, 1977; Smith and Lewis, 2005; Docola *et al.*, 2011). Dans le cadre de cette thèse, j'ai donc étudié les blessures causées par la méthode de micro-injection en faisant des observations macroscopiques et microscopiques des blessures sur des troncs qui étaient issus d'essais de la méthode en conditions réelles.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la résilience externe et interne de la blessure de micro-injection en examinant au cours du temps l'évolution des processus mis en place afin, *in fine*, d'évaluer le risque occasionné par cette méthode pour la santé de l'arbre.

Ce chapitre est constitué de deux parties correspondant à deux espèces ligneuses différentes. La première porte sur la résilience des blessures causées par la micro-injection

sur des pommiers traités contre le puceron vert (*Aphis pomi*) ou contre la tavelure (*Venturia inaequalis*). Cette partie fait l'objet d'un article soumis pour publication (article 2). Dans la deuxième partie, la cicatrisation de la blessure d'injection a été évaluée sur des pieds de vigne.

2. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental général suivi dans ce chapitre (dans l'article et dans la partie sur la vigne) est présenté dans la Figure 12.

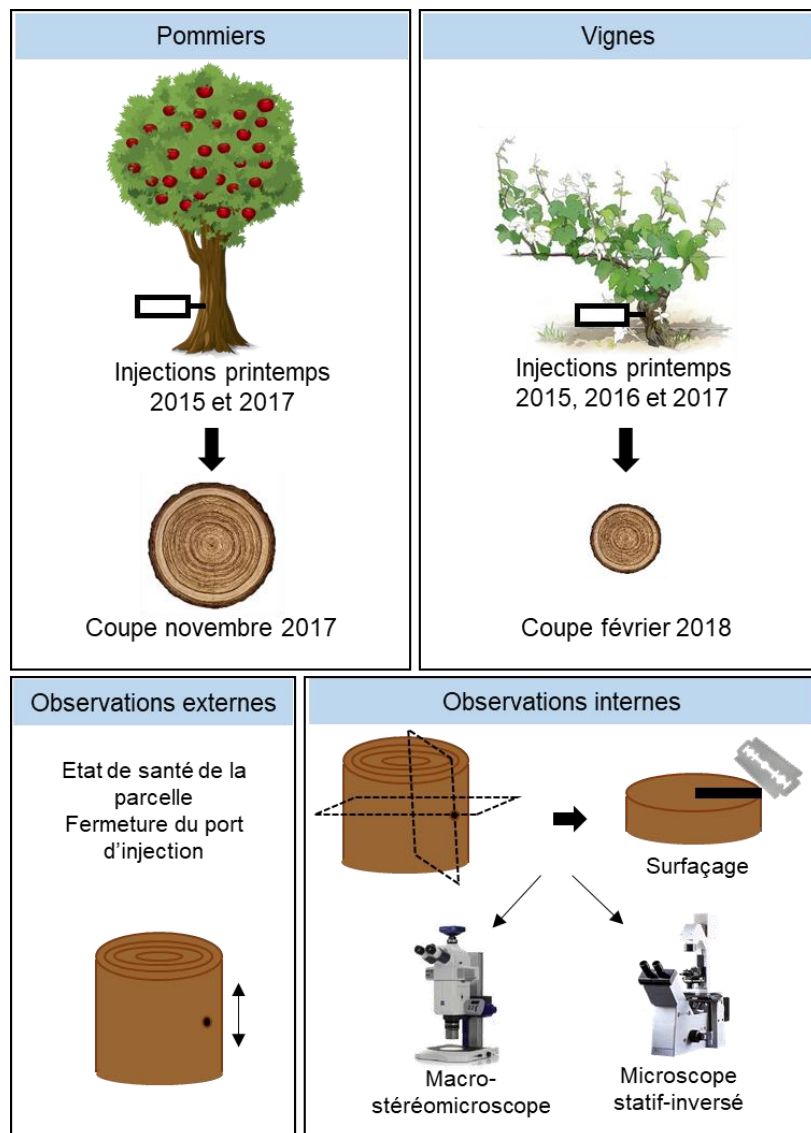


Figure 12 : Dispositif expérimental utilisé pour étudier la résilience de la blessure d'injection.

Les troncs de pommiers proviennent d'essais d'injection réalisés en 2015 et 2017 dans le cadre du projet PREAMISSE par le CTIFL et le CETEV au centre opérationnel de Lanxade (CTIFL, Prignonrieux, 24). Les troncs ont été coupés en novembre 2017. Les vignes ont été injectées en 2015, 2016 et 2017, aussi pour le projet PREAMISSE par le CETEV à l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV) de l'Isle sur Tarn (31) et les ceps récoltés en février 2018. Les observations internes ont été effectuées sur des coupes radiales ou transversales avec un stéréo-microscope à zoom et un microscope à statif inversé sur la plateforme d'imagerie de la Fédération de Recherche Agrobiosciences, Interactions et Biodiversité d'Auzeville (Centre Toulouse-Occitanie, INRA, 31).

3. Article 2 : Résilience de la blessure d'injection chez le pommier

Article 2 : Wound resilience of trunk injection in apple trees as determined by macroscopic and microscopic observations

Article soumis dans *Plant Pathology* le 30 août 2019

C. Berger¹, A. Jauneau², F. Laurent^{1*}

¹ Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

² Plateforme Imagerie-Microscopie, CNRS, Université de Toulouse, UPS, Fédération de Recherche FR3450 - Agrobiosciences, Interactions et Biodiversité, 31326 Castanet-Tolosan, France

* Corresponding author: François Laurent, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

E-mail: francois.laurent@inra.fr

Phone: +33(5)82066357

RUNNING HEAD: Trunk injection wound resilience

RESUME

L'injection dans le tronc des arbres pour appliquer des produits phytosanitaires offre une alternative aux méthodes de traitement conventionnelles, par pulvérisation notamment. Par la nécessité de délivrer des produits phytosanitaires à l'intérieur du tronc, cette méthode cause une blessure à l'arbre. L'objectif de cette étude était d'évaluer les conséquences de l'injection sur la santé des pommiers ainsi que la réponse de l'arbre à cette blessure et la résilience de celle-ci.

Les pommiers ont été injectés avec différents produits phytosanitaires aux printemps 2015 et 2017 pour des essais d'efficacité de la méthode contre les pucerons verts du

pommier ou la tavelure au CTIFL de Prignonrieux. Les injections ont été réalisées avec une aiguille d'un diamètre de 2 cm et d'une longueur de 1,9 cm en appliquant une pression manuelle. Les arbres ont été abattus en novembre 2017. Des observations externes des blessures sur l'écorce ont été effectuées. Des coupes transversales et radiales ont ensuite été réalisées au niveau du port d'injection pour effectuer des observations macroscopiques au stéréo-microscope à zoom en fluorescence et microscopiques au microscope à statif inversé. Un arbre a aussi été injecté avec de l'eau, du difénoconazole ou juste perforé par l'aiguille afin de mesurer l'impact de chacun sur les symptômes observés.

Diverses modifications telles que la coloration du bois ou la mise en place d'une assise de cellules aux parois subéro-ligneuses en périphérie de la blessure, sont apparues au niveau cellulaire et tissulaire qui peuvent être reliées aux différentes barrières du CODIT. Après une saison de croissance (année de l'injection), la plupart des ports ont été fermés et après trois saisons, l'écorce et le bois ont retrouvé leur structure normale et le xylème, sa capacité de transport de la sève. Les principaux symptômes de cicatrisation étaient liés à la perforation mécanique et l'injection de difénoconazole n'entraînait qu'une expansion modérée de la surface de la zone de bois coloré sans augmentation des lésions.

Cette méthode d'injection du tronc avec une aiguille de petit diamètre n'a pas eu un impact important sur la santé des arbres. La blessure cicatrise rapidement avec, dans la plupart des cas, une fermeture totale du trou d'injection et seul un très faible volume de bois ayant perdu sa fonctionnalité. Cela devrait permettre une utilisation répétée de cette méthode sur les mêmes arbres et durant plusieurs années, proposant ainsi un moyen durable d'application de produits phytopharmaceutiques.

ABSTRACT

Trunk injection is an alternative to conventional methods of applying plant protection products to trees. However, by delivering plant protection products inside the trunk, the method inevitably wounds the tree. We assessed wound resilience in apple trees after injection using a 2 mm diameter needle with no preliminary drilling. Trees were injected in spring 2015 and 2017 and were felled in November 2017. Wounds were analysed using external and internal, macroscopic and microscopic imaging. Various barriers were observed at cellular and tissue level. After one growing season, most of the ports had closed and after three seasons, the bark and wood had recovered their normal structure and xylem had recovered its capacity to transport sap. The main symptoms of healing were associated

with the hole and injection of the active ingredient itself only led to expansion of the area of discoloured wood but no increase in injury.

The trunk injection method using a small diameter needle had no major impact on tree health, the injection port closed rapidly and only a very small volume of wood lost its functionality. We thus conclude trunk injection is a sustainable method for supplying plant protection products to trees

KEYWORDS: trunk injection, injection wound, wound reaction, compartmentalization, pest management, apple tree

INTRODUCTION

Trunk injection is an environmentally friendly way to deliver plant protection products (PPP) and nutrients to trees. Standard methods of application used for trees, such as spraying, have negative side effects on human and on the environment due to PPP loss due to drift. Trunk injection is an alternative method in which PPP are directly delivered inside the tree, thereby avoiding drift (Vandervoort C, 2014). The PPP are then distributed to the canopy via the sap. Trunk injection is particularly valuable for use in large trees, in urban areas, and where other methods are impracticable or inefficient (Aćimović et al., 2016; Vandervoort C, 2014).

Most injection techniques require drilling a hole in the trunk before injecting large volumes of PPP, but two devices make it possible to inject the product directly through a needle, without the need to drill a hole beforehand, Bite® (P.A.N srl, Padova, Italy) and Wedgle® (ArborSystems LLC, NE USA). Injection hole diameters range from 2 mm to 9.5 mm. Most bits or needles are cylindrical in shape but some needles are lenticular (Aćimović et al., 2016; Montecchio, 2013). In some cases a plug is placed in the hole after treatment (Aćimović et al., 2016).

The use of trunk injection methods has been limited up to now because of the wound caused by the injection and its consequences for the health of the tree (Montecchio, 2013; Perry et al., 1991). The risks for trees include decay, cambial damage, exposure of both the inner bark and of the outer rings of sapwood (Dujesiefken et al., 2005). In some species, a large callus forms, thereby discouraging the use of the method (e.g. in plane trees, F. Laurent, personal communication). The hole can also be an entry point for pathogens (Aćimović et al., 2016; Ferracini and Alma, 2008; Perry et al., 1991). In addition, the

pressure of the injection and the chemicals applied can increase the effects associated with the injection (Shigo et al., 1977a; Smith and Lewis, 2005). Methods with the smallest possible impact that can be used several times on the same tree are thus needed.

When a tree is wounded, a response mechanism closes the wound and isolates the healthy part of the tree from outside (Biggs, 1985; Dujesiefken and Rhaesa, 1999; Morris et al., 2016; Neely, 1988). The response is the same when the wound is caused by trunk injection. Shigo (1984) described the process of healing developed by trees as the CODIT model. He showed that the tree compartmentalizes the wound by walling off the injured tissues physically and chemically to protect the tree against wood-destroying microorganisms (Shigo, 1984). Good wound healing is a prerequisite for the use of trunk injection.

Although many authors have characterized the tissue or cellular processes involved in healing the tree injuries, resilience to the wound caused by trunk injection has usually only been monitored by superficial observation of the bark surface, and injection-port closure has been the main factor evaluated (Aćimović et al., 2016; Ferracini and Alma, 2008; Percival and Boyle, 2005). Rarely have authors focused on internal injuries and wound responses. When trees are felled, most observations were made with the naked eye (Doccola et al., 2011; Shigo et al., 1977a, 1977b; Smith and Lewis, 2005). Dissection studies using macroscopic or microscopic observations are needed to assess injuries to the internal tissue and to evaluate tissue regeneration.

The two objectives of this study were thus to assess tissue injuries caused by the injection method, and wound resilience. The overall goal is to assess the sustainability of the needle trunk-injection method to validate a PPP application method that can be used for many years in the same apple orchards.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Apple trunk samples were collected in November 2017, 7 and 31 months after different plant protection products had been injected in two field trials conducted in a 15-year-old apple orchard (CTIFL, Prignonrieux, France). The trunks were cut 30 cm above and below the injection site. The sections were coated with pine tar (Lhomme-Lefor) to prevent desiccation of trunk samples.

Field trials

Plant protection products (PPP) were supplied to the apple trees by injection of active substances in commercial preparations. The PPP preparation (1 mL) was applied at each port. Trunk injections were performed with Wedgle® Direct-Inject System (ArborSystems LLC, NE USA). The needle, 19 mm long and 2 mm in diameter, was manually inserted into the hardwood through the bark. Two injection ports were made per tree, about 50 cm above the ground.

The first trial in spring 2015, consisted of injecting acetamiprid (10 mg/ml, Supreme®), spirotetramat (24 mg/ml, Movento®) or tau-fluvalinate (9.6 mg/ml, Klartan®) to control aphids.

In the second trial in spring 2017, trees were injected with potassium phosphonate formulated at 740 mg/ml or difenoconazole (12 mg/ml or 24 mg/ml) against apple scab (*Venturia inaequalis*). The diameter of the apple trees selected for the study were 5.8 ± 0.7 cm measured 50 cm above the ground.

In order to determine the origin of the discolored wood, in June 2018, the trunk of one apple tree was injected with 1 mL difenoconazole (16 mg/mL), 1 mL of pure water or the trunk was injected but no solution was delivered. This tree was cut down five months later in November 2018.

Bark observation and sample preparation

After felling, the injection ports on the surface of the bark were examined with the naked eye. Different parameters were measured: the diameter of the external blister, the diameter of the needle hole (internal diameter), and if any, the length of the crack in the bark (Figure 1).

The trunks were then sawed transversely at the external limit of the injection hole into 2 cm thick slices. The slices were conserved in 70% ethanol/water solution at room temperature, until observation. In some cases, radial sections were cut.

Macroscopic and microscopic observations

Just before observations, a razor blade was used as a plane to make the surface to be imaged as smooth as possible. These thick samples were observed under a macro-stereomicroscope, Axiozoom V16 (Zeiss, Germany). Images were acquired using a 1x

objective lens (N.A. = 0.5*0.125) in bright field and epifluorescence (UV range for excitation and a band pass filter, 445/50 nm, for emission).

For microscopy, semi-thin sections were placed on a glass slide in distilled water and covered with a cover slide. They were observed in bright field and epifluorescence (blue excitation range and long pass filter, LP 510nm, for emission) using an inverted microscope (DMIRBE-Leica) equipped with a colour-CCD for image acquisition (MC 190H Leica CCD camera, Germany).

RESULTS

The injection method used here, called microinjection because it does not use a drill bit but only a needle, is expected to minimize the wound caused by the injection. In addition, only a small volume (1 mL of PPP preparation) is injected. Compared to drill bit methods, the diameter of the needle, 2 mm, is smaller and no bark or wood material is removed. Consequently, the impact on the trunk is expected to be lower and the healing process shorter. Our observation suggest that the impact of the injection does not depend on the active substances (a.s.) injected into the trunk. The variability of the healing time prevented us from distinguishing between the different molecules. Therefore, sample observations, and measurements were grouped by month after injection independently of a.s. Overall, the trees were not negatively affected by the injection. All the trees were healthy and no trees were lost.

Observation of the wound on the bark surface:

External observations of the injection site showed, in the best case (Figure 1a), a disk shaped wound: a round blister on the bark with a hole in the center. About 7 months after the injections made in 2017, the average diameter of the blister was 6.0 ± 1.8 mm and that of the central hole was 1.3 ± 0.7 mm (n=20). Thirty-one months after the injections made in 2015, the average diameter of the blister was 7.1 ± 1.8 mm and the average diameter of the hole was 1.5 ± 1.0 mm (n=20). In the worst cases, there was a vertical crack in the bark (Figure 1b). Of the total of 40 injection ports observed, 26% were split and the average length of the split was 20.2 ± 9.1 mm. In most cases, it was difficult to determine if the bark at the bottom of the hole was completely healed.



Figure 1: Photographs of trunk injection ports 7 months after the injection, showing the injection hole and the impact on the bark (a) normal healing port, d= internal diameter, D= external diameter. (b) Port with a crack, L= length of the crack in the bark. Scale bar = 5 mm.

General features of internal wound:

As external observation was not an efficient way to determine if the wound had closed and if the internal tissue was damaged, the apple tree trunks were cut at the level of the hole to analyze the structure of tissues under different kinds of light. Seven months after the injection, a radial cut in the axis of the port axis showed, in visible light, discoloured areas in both the bark and the sapwood, separated by a normal coloured but disturbed area of sapwood (Figure 2a). Fibres of sapwood in the discoloured area were cut in the axis of the hole and the width of the disturbed fibers was 3.22 ± 0.11 mm. The discoloured area extended above and below the cut. The normal coloured ring was a newly formed ring which developed after injection, called “woundwood”. This new ring was separated from the ring formed prior to injection by a brown line.

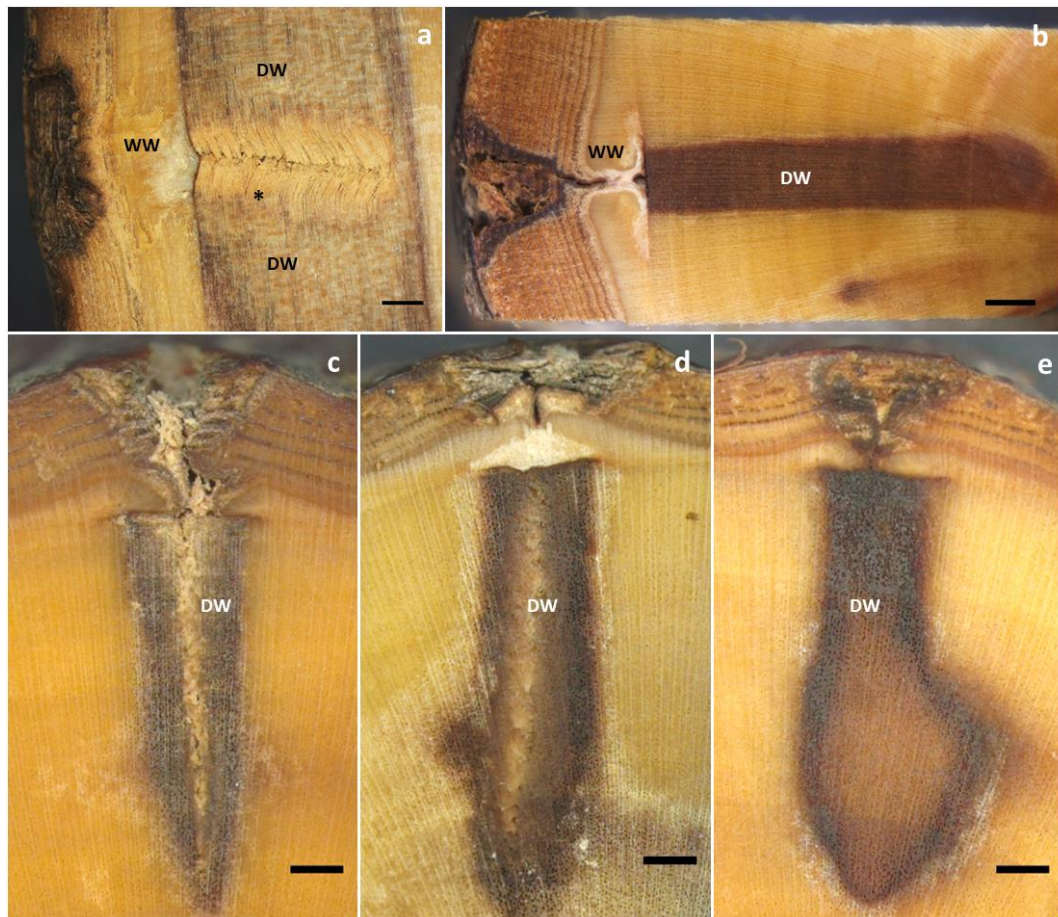


Figure 2: Bright field macroscopy observations of a trunk section at injection ports, 7 months (a,b) and 5months (c,d,e) after injection. (a) Radial section showing a typical injection wound: cut fibres (asterisk), the woundwood (WW) formed and the discoloured wood (DW) above and below the hole. (b) Transverse section. c,d,e compare the transverse section (c) after only needle perforation, (d) after injection of water, (e) after injection of difenoconazole (c). The discoloured wound area increased with the injection of liquid, especially with difenoconazole. Scale bar: a,b= 2 mm; c,d,e=1 mm.

Figure 2b shows the typical pattern of an injection port transversely cut into the trunk, 7 months after injection, with the different responses of the tree tissues to the aggression represented by the injection. The wound was shaped like a funnel with a conical area of discoloured bark with crushed bark in the middle and at the bottom of the cone, a pipe sinking into the inner bark layer and woundwood. Under this last ring, a rectangular shaped discoloured area appeared in deeper sapwood rings. In the cross section, the width of the outer side of the discolored areas (3.5 mm, Table I) was about the same as the width of the disturbed fiber measured in the radial section.

The impact of the injection on the bark was clearer under fluorescence (Figure 3a). The cone of discoloured bark was surrounded by a fluorescent blue line, indicating a ligno-suberised layer (LSL). This layer extended beyond the bark to the outer surface of the

discoloured area (Figure 3a). Near the outer surface of the bark, the layer formed between 0.8 and 1 mm deep in the wound surface. However, the layer became progressively shallower as the wound reached inner tissues, thereby giving the conical shape to the desiccated discoloured bark. The LSL sometimes also appeared on the outer side of discoloured area. In some well closed holes (figure 2b), intussusception of the innermost bark layer was observed, the recent whitish layer in woundwood reached the discoloured area. In some worst cases, the hole was not completely closed (Figure 3b).

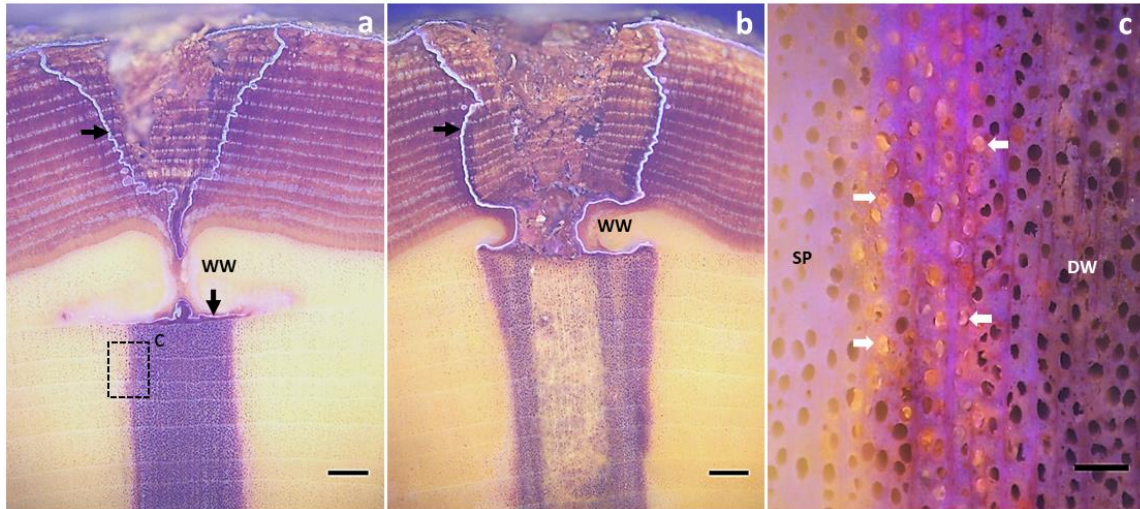


Figure 3: Transverse section of the injection site under fluorescence macroscopy 7 months after injection. (a) A well closed hole. A ligno-suberised layer (black arrows) appeared around the hole in the bark and in the upper part of the discoloured wound. (b) A hole still not closed after the first growing season but woundwood (WW) has started to form. (c) Limit between the normal sapwood (SP) and the discolored wood (DW). Tysolses (white arrows) are occluding vessels at the edge of the discoloured zone. Scale bar: a,b = 1 mm; c = 0.1 mm.

The symptoms described were mainly caused by the physical injury to the tree caused by the injection needle, and even when no liquid was injected, discolored wood appeared (Figure 2c). Whether the injection included material or not, the symptoms were the same. However, the injection of liquid increased the discoloured area in the sapwood (+ 35% with water alone; $n=3$) (Figure 2d), and the presence of difenoconazole significantly increased (+ 73%) the discoloured area ($p\text{-value} = 0.0028$; $n=3$) (Figure 2e). The mean surface area of the discoloured zone in the case of injection without a liquid, with water, and with difenoconazole were $14.63 \pm 0.22 \text{ mm}^2$, $18.94 \pm 2.15 \text{ mm}^2$ (+35%) and $25.35 \pm 1.90 \text{ mm}^2$, respectively ($n=3$). The increase in area was mainly due to an extension in the width of the area of discolored wood at the tip of the needle, i.e. where the product came out.

Fluorescence microscope observations provided more information about the tissues affected by the injection (Figure 4a). Figure 4b shows the detailed structure of the LSL formed by 2 or 3 disorganised layers of parenchyma cell with ligno-suberised thickened walls. Xylem vessels formed in the extreme part of the woundwood, but in the middle, the structure was perturbed, no vessels were present (Figure 4c). Figure 4c shows one edge of the discoloured area interfacing with healthy sapwood in the same aged ring. The lumen of some vessels were clogged by tyloses. Parenchyma were densified with wall thickening by lignin-suberin deposition and the ray parenchyma (RP) were characterised by dark contents. Outside the discoloured area, the sapwood was normal, with open vessels, thin wall parenchyma and normal RP (Figure 4e).

A transect observation through the woundwood ring from the discoloured sapwood to the more recent bark revealed the changes that took place in this tissue during healing. The oldest woundwood, formed at the surface of the discoloured sapwood, was made of a rectangular cell stack, like homoxylous wood (Figure 4a,d). Starting from the LSL, the walls of the first two to three cell layers were lignified (Figure 4d). By contrast, outside this well-organised parenchyma, the woundwood was disorganised with some inclusions of suberin deposits (Figure 4a,e), whereas the most recent woundwood was structured like sapwood tissue with parenchyma and RP but, at this stage, there were still only a small number of xylem vessels (Figure 4a,c).

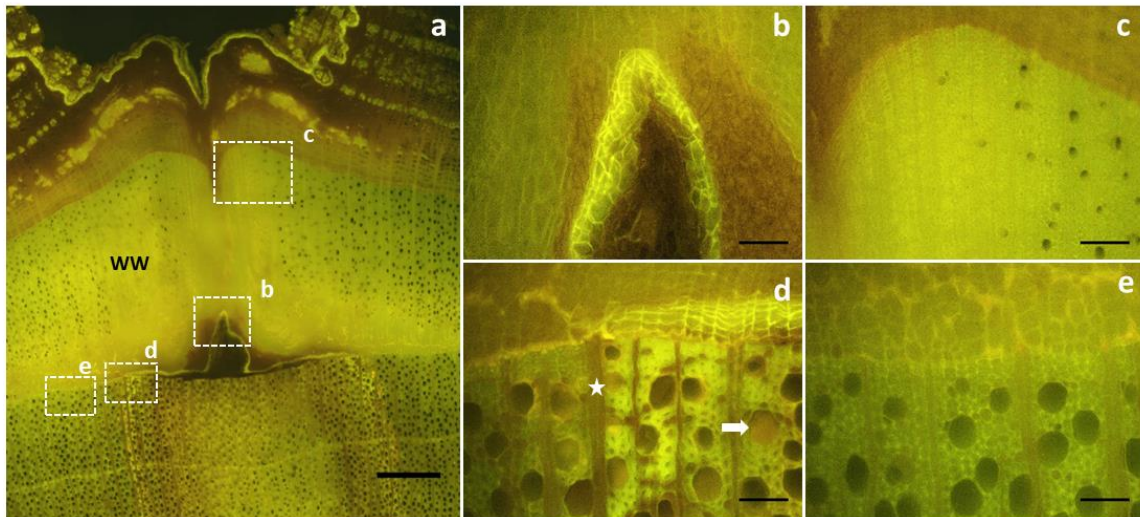


Figure 4: Transverse section of a wound under fluorescence microscopy 7 months after injection. (a) A well closed wound. (b) The ligno-suberised cell layer. (c) Xylem in the woundwood (WW), no vessels are present in the axis of the perforation. (d) Xylem in the upper part of the discoloured wood. Ray parenchyma are dark in colour (star) and vessels are occluded by tyloses (white arrow). (e) Intact xylem in the old sapwood (SP), outside the discoloured wood. Vessels are intact. Scale bar: a= 1 mm; c= 0.2 mm; b,d,e= 0.1 mm.

Resilience time of the wound on apple tree

Observation of transverse sections of the trunk 7 and 31 months after the injection allowed us to monitor the changes that took place while the wound was healing. Table 1 lists the measurements of the affected zone in the bark and the discoloured wood made on the two occasions.

Table 1: Measurements of the discoloured wood and of the impacted zone in the bark (the zone surrounded but the ligno-suberised layer) in transversal section, 7 and 31 months after injection. \pm standard error.

Months after injection ^a	Bark necrosis		Discoloured wood		
	Length, mm	Surface area, mm ²	Length, mm	Width, mm	Surface area, mm ²
7 (7)	5.7 \pm 0.5	19.3 \pm 5.5	16.6 \pm 1.5	3.8 \pm 1.1	60.6 \pm 15.9
31 (7)	5.3 \pm 1.7	22.8 \pm 5.1	12.5 \pm 3.3	3.6 \pm 0.6	40.7 \pm 12.7

^a The number of ports observed is in brackets

Seven months after an injection, i.e. after one (May to November) growing season, in the case of an injection made in the spring of 2017, generally the wound was already isolated from outside and well compartmentalized. No signs of decayed tissues or invasion by parasites were observed (Figure 3a). On this occasion, five of the seven injection ports observed were completely closed from outside by the LSL and the woundwood (Figure 3a). New sapwood and liber tissues had developed but these functional rings were discontinuous and the woundwood still formed a full circle. There were no xylem vessels in a 2 to 3 mm zone (Figure 4c). However, the size of the section impacted by the wound was small, 80 to 100 mm². In the case of the two injection ports that had still not closed, woundwood had formed but it did not close the hole. Furthermore, the LSL was forming but had not yet completely isolated the wood from the outside (Figure 3b).

Similarly, seven ports were analyzed 31 months after injections made in the spring in 2015. On this occasion, only one of the seven ports observed had not yet completely closed. The six others were well sealed by the LSL (Figure 5a). The cambium had recovered its ability to form complete xylem and phloem rings. In half these cases, the last rings had a normal pattern with well-developed vessels (Figure 5b). The average width of the last ring (2017 growing period) was 5.14 \pm 1.31 mm (n=3) in the axis of the hole and no differences

in ring width, density and in the diameter of the vessels were found between this ring and the healthy sapwood ring. In the other half, the holes were completely closed but the most recent Rings were still disturbed, and the average width of the new rings was only 2.73 ± 0.41 mm (n=3). In all ports, the area of discolored wood areas (40.70 ± 12.70 mm²) was significantly smaller than that measured 7 months after injection (-33%, p-value=0.04425).

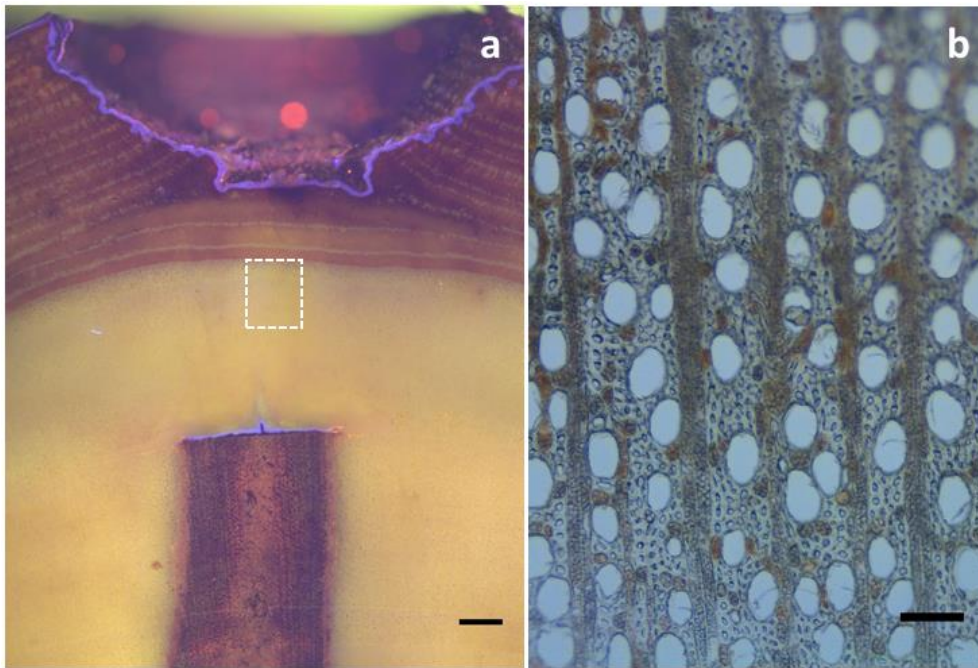


Figure 5: Transverse section of a wound 31 months after injection. (a) Observation under fluorescence macroscopy of a well closed hole. The new rings appear to be functional. (b) Newly formed sapwood with intact vessels. Scale bar: a = 1 mm; b = 0.1 mm.

DISCUSSION:

This is the first report on macro- and microscopic observations of the impact on tree tissues of the trunk injection process. The different symptoms were monitored three years after the injection. Image analysis made it possible to highlight port closure and to evaluate the time required for the active tissues (liber and sapwood tissues) to recover their integrity and probably their functionalities. These results advance our understanding of the effect of trunk injection and the wound healing process and showed that injection with a needle, with no previous drilling and no wood material removed, only affected a small volume of the trunk. Injection had no long-term negative effects, the damage to the very small quantity of tree tissues affected was mainly due to the mechanical impact of the needle.

External observations of the bark provided little information on the real status of the wound and the closure of the hole. These observations only showed that the bark had been crushed where the needle entered the trunk, and in some cases, the impact of the needle base. Over the course of time, this caused low induration. Consequently, and due to the small diameter of the hole, it was often difficult to determine if the hole was completely closed. Nevertheless, this non-destructive observation gave us an idea of the health status of the injury since no black leaks were observed which may be the case after infection by pathogens. The external observation revealed the presence of bark cracking in some cases but given the small diameter of the needles used in our study, the cracks were relatively small. The size of the crack in the bark depends on the method of injection used, more precisely on the diameter and the shape of the port. Aćimović et al. (2016) showed in apple trees that the largest cracks were sealed 9.5 mm ports made by drilling and blade ports. Smith and Lewis (2005) reported that more bark cracks were caused by the 8 mm diameter of the Arborjet® bit, and fewer by the 2 mm diameter of Wedgle® device. When the bark cracks, the hole does not usually close properly.

Following the injection, different reactions were observed in the trunk tissues. The main changes were discoloured zones in the bark and in the sapwood, with the formation of tyloses in the adjacent vessels of discoloured sapwood and a LSL from the outer bark to the surface of the sapwood. Woundwood developed and closed the hole after some months. When cambium was continuous, the LSL also completely isolated the hole from the outside. At the end of the first growing season after the injection, the most recently formed woundwood did not yet contain vessels in the axis of the perforation. These observations were interpreted as a normal reaction to wounding. Wound response in trees was well described by Shigo (1979), who developed the compartmentalization concept of decay in trees after wounding (CODIT model). The compartmentalization process is based on the creation of a “barrier zone” that restricts the entry and the development of pathogens (Shigo, 1984). An LSL forms a barrier around the wound at the level of the bark, sometimes extending to the sapwood (Biggs, 1985). LSL develops in the perpendicular direction to the outside surface of the bark (Biggs, 1985; Oven et al., 1999; Woodward and Pocock, 1996). According to Biggs (1986), this layer develops about 800 µm deep through the bark. In the present study, this was the case near the bark surface, but the LSL approached the wound surface deep inside the lesion. When the hole was not fully clogged, LSL did not

approach the surface of the lesion. Thus, the depth of LSL is hypothesised to be related to the local desiccation in the wound as suggested by (Oven et al., 1999). With time, new phellogen produces a new continuous bark layer (Biggs, 1985). Sometimes, an LSL is formed on the outer edge of the discoloured wood. This is probably a sign that, due to an injection with excessive pressure, the bark detached from the sapwood ring. Like the phellogen, the vascular cambium produces new tissues. The resulting altered wood, called woundwood, restores ring continuity and facilitates wound healing and completely isolates the wood from outside (Morris et al., 2016; Smith, 2015). Near the wound, the woundwood xylem contains narrower and more numerous tracheid elements (Smith 2015). Furthermore, the rays are more numerous and larger. Due to the altered anatomy and to the reduction in the number of vessels in the woundwood, the hydraulic flow is less than in healthy xylem (Smith, 2015). In the present study, at the end of the first growing season after wounding, the woundwood did not yet contain any xylem vessels and RP were numerous but finer. Usually, a chemical barrier is produced to separate the woundwood from the wood that was present before wounding (Morris et al., 2016). The characteristics of this discolored wood are the high concentrations of polyphenols, such as flavonoids, tannins in the xylem and ray parenchyma, as well as its low moisture content (Shigo, 1984; Eyles et al., 2003; Vek et al., 2013). These polyphenols act either as mechanical or chemical barriers to pathogen penetration or as impervious barriers to protect the healthy sapwood from desiccation (Morris et al., 2016; Vek et al., 2013). The vessels at the edge of the discolored zone are filled by tyloses, formed by expansion of the parenchyma cells which creates a physical barrier limiting the up and downward movement of pathogens (Morris et al., 2016; Rioux et al., 1995).

The origin of the symptoms observed was determined. Discolouration of xylem tissues was mainly the reaction of wood parenchyma to the mechanical aggression of perforation by the needle. Injection of water - and more so when the active ingredient (ai) solution was injected - increased the discoloured area, probably due to phytotoxicity of the high concentration of ai in the cells associated with the vessel. In some cases, the phytotoxicity of the preparation could lengthen the healing process, particularly when the injection pressure detached the bark, releasing the phytotoxic preparation towards the cambium and liber cells. However, even when the injection included chemicals, the discoloured zone was very small and the wound response was limited to around the needle

hole. However in practice, the extent of damage will depend on the chemical used. Shigo et al., (1977), showed that injections of water caused short columns of discolored wood and negligible amounts of cambial dieback whereas injections of chemicals triggered more severe symptoms than the wound itself, depending on the chemical used, its concentration and on the volume injected. However, these authors drilled a hole through which the products were injected. In the present study, different chemicals were injected but neither molecule caused injuries greater than the symptom variability observed at different injection ports used for the same molecule. The method used in this study made it possible to inject very small volumes (1 ml). To compensate, we had to inject solutions that were highly concentrated to make them efficient, which increased the compartmentalization area. However, lateral compartmentalization did not block the translocation of the plant protection product in the injection area because active substances were detected in the canopy (data not shown).

Dissection revealed different healing patterns in apple trees with variability in the closure of ports from the unclosed to the fully compartmentalized wound. The hole closed in most of the trees in less than 7 months and the ring formed in the following year already appeared normal. From the first growing season after the injection, the cambium started actively producing new vascular tissues, even when the bark had been detached from the wood by the pressure of the injection. These new tissues were not immediately functional, and during the first months no xylem vessels were visible in the freshly formed woundwood. But the new tissue contributed to the more rapid closure of the hole. Overall, in both years combined, in 79% of cases the wound completely closed. Docola et al., (2011) reported similar results for green ash injected from one to four years before being cut, with a total of 76.2% of closed ports.

It thus appears that the health risks associated with microinjection are low, as the trees were not invaded by pathogens. This was also the case for Shigo et al. (1977) and Percival and Boyle (2005). The compartmentalization of the injection wound explains why trees are not infested and decay, and why the injury caused by the injection is not fatal to the tree (Shigo et al., 1977a).

The limited area of tissues disrupted by the microinjection also contributed to efficient closure. Two years after injection, the impacted area of the tree was smaller and the new rings successfully started their growth with some vessels. In almost half the cases, no

differences were observed between new tissues in the wound zone and normal ring tissues. Based on external observations of the bark on apple trees and *Quercus robur*, Percival and Boyle (2005) reported that the ports were completely closed at the end of the first growing season. By contrast, Aćimović et al. (2016) reported that the holes in apple trees were closed in one to more than two years but only based on external assessment. Our observations confirmed that the ports were closed by new tissues, and that these new tissues were functional after two years.

Different factors influenced the injection wound reaction. The variations in wound closure can be explained by the speed of growth of the rings and the health of the tree. A limited area of cambium was injured by the needle, so new phloem and xylem tissues were rapidly formed from cambium cells, thereby closing the hole. However, the time to completely recovered functionality was longer because of the absence of vessels in the woundwood tissues in the axis of the hole. (Doccola et al., 2011) reported that one year later, 63% of this variation can be attributed to ring growth. The speed of ring growth is often linked to the general health of the tree and this factor has a direct impact on healing. The above authors showed that the ash trees badly affected by the Emerald ash borer were those that did not heal quickly.

The method of injection is another major factor. The method used in the present study, with no previous drilling and using small diameter needles, did not appear to cause significant damage to the tree. The main damage was probably the impact of the needle base on the bark and underlying tissues. The perforation by a small diameter needle with no tissue being removed limited injury to a small volume, about the same as the diameter of the needle. The main factor limiting the use of the trunk injection has been linked with the wound created by drill-based methods because they overheat the cambium responsible for wound closure and all the surrounding tissues (Montecchio, 2013). Aćimović et al., (2016) showed that the fastest closing holes are those of small diameter or lenticular ports, while the 9.5 mm diameter drill port sealed with a plug is the longest to close. The plug is supposed to close the hole to prevent pathogens entering but it actually prevents the natural closing of the hole. Moreover, the results of the present study in which no plugs were used, did not reveal the presence of pathogens. This was also the case for Shigo et al. (1977) and Percival and Boyle (2005) who reported no signs of infection. Indeed, the main function

of the tree compartmentalization reaction to the wound is to prevent the entry of pathogens into host trees.

The objective of this study was to assess the impact of needle injection on tree health to determine whether this technique is appropriate for the delivery of PPP to trees. Needle injection limits damage, leading to better wound resilience than drill-based methods. In addition, the small diameter of the needle is better for tree health (Costonis, 1981) but the surface area of vessels irrigated by the liquid delivered is smaller, the active substances reach a smaller area of the crown. Aćimović et al. (2016) showed that when the diameter is larger, the interface with the vascular system is larger and the distribution of active substances is therefore more uniform. However, with needle injection, the portion of disrupted vessels is smaller, minimizing the risk of embolism due to the loss of vessel functionality. It is important to take the risk of embolism into account particularly when the hole is bigger. Other factors can have an impact such as injection pressure, product formulation, tree anatomy and environmental conditions (Smith and Lewis, 2005). Even with a hand pressure injection, detachment of the bark was detectable with the naked eye during injection in the form of bark swelling. On the other hand, it should be underlined that injections need to be repeated for several years. In this study, injections were limited to one time in the same year. To be able to reinject, the injection ports will have to be staggered in the first few years (Costonis, 1981). The time needed before being able to inject again in exactly the same place is not known and the impact of repeated injections over time remains to be tested.

CONCLUSION

After trunk injection with needles, apple tree set up different processes of compartmentalization and wound healing, and in the present study, most of the ports were closed after one growing season. A continuous subero-lignin barrier formed from the outer bark to the surface of the sapwood ring to prevent pathogens from entering and spreading. Already the end of first growth season, phellogen and vascular cambium recovered their continuity to form new bark, and a new ring of liber and sapwood. However, the new xylem formed in the injection axis only recovered its entire water conduction ability after only two or three years although the volume of xylem affected by the injection was very small. In addition, this study showed that after injection, the symptoms were mainly related to the

hole created by the needle rather than to the delivery of the liquid. Nonetheless, the injection of plant protection products increased the discoloured area in the sapwood and therefore the volume of the compartmentalized tissues, probably due to the phytotoxicity of the highly concentrated solution.

Needle injection without drilling formed a small clean wound that healed rapidly with no negative effect on the tree. This should allow the repeated use of the injection method in the same year for treatments requiring several doses of PPP or in subsequent years without major damage to the health of the tree and its growth.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by grants from the French “Competitiveness Cluster Program – Single Interdepartmental Fund”, BPI France Funding. The authors thank CETEV (Le Faget, France), particularly Dr Adeline Renier, for trunk injection management and CTIFL (Prignonrieux, France), Mrs Florence Verpont, for providing us with the apple trees. We also would like to thank Mrs Daphne Goodfellow for reviewing the English writing.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Aćimović, S.G., Cregg, B.M., Sundin, G.W., Wise, J.C., 2016. Comparison of drill- and needle-based tree injection technologies in healing of trunk injection ports on apple trees. *Urban For. Urban Green*. 19, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2016.07.003>
- Berger, C., Laurent, F., 2019. Trunk injection of plant protection products to protect trees from pests and diseases. *Crop Prot.* 124. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.05.025>
- Biggs, A., 1985. Suberized boundary zones and the chronology of wound response in tree bark. *Phytopathology* 75, 1191–1195.
- Biggs, A.R., 1986. Phellogen Regeneration in Injured Peach Tree Bark 463–470.
- Costonis, A.C., 1981. Tree injection: perspective macro-injection/micro-injection. *J. Appl. Ecol.* 7, 275–277.
- Doccola, J.J., Smitley, D.R., Davis, T.W., Aiken, J.J., Wild, P.M., 2011. Tree wound responses following systemic insecticide trunk injection treatments in green ash (*Fraxinus Pennsylvanica* Marsh.) as determined by destructive autopsy. *Arboric. Urban For.* 37, 6–12.

- Dujesiefken, D., Liese, W., Shortle, W., Minocha, R., 2005. Response of beech and oaks to wounds made at different times of the year. *Eur. J. For. Res.* 124, 113–117. <https://doi.org/10.1007/s10342-005-0062-x>
- Dujesiefken, D., Rhaesa, A., 1999. Tree wound reactions of differently treated boreholes. *J. Arboric.* 25, 113–123.
- Ferracini, C., Alma, A., 2008. How to preserve horse chestnut trees from *Cameraria ohridella* in the urban environment. *Crop Prot.* 27, 1251–1255. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.03.009>
- Montecchio, L., 2013. A Venturi Effect Can Help Cure Our Trees. *J. Vis. Exp.* 1–8. <https://doi.org/10.3791/51199>
- Morris, H., Brodersen, C., Schwarze, F.W.M.R., Jansen, S., 2016. The Parenchyma of Secondary Xylem and Its Critical Role in Tree Defense against Fungal Decay in Relation to the CODIT Model. *Front. Plant Sci.* 7, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01665>
- Neely, D., 1988. Tree wound closure. *J. Arboric.* 148–152.
- Oven, P., Torelli, N., Shortle, W.C., Zupancic, M., 1999. The formation of a ligno-suberised layer and necrophylactic periderm in beech bark (*Fagus sylvatica* L.). *Flora* 194, 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0367-2530\(17\)30892-7](https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)30892-7)
- Percival, G.C., Boyle, S., 2005. Evaluation of microcapsule trunk injections for the control of apple scab and powdery mildew. *Ann. Appl. Biol.* 147, 119–127. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.00019.x>
- Perry, T.O., Santamour, F.S., Stipes, R.J., Shear, T., Alex, L., 1991. Exploring alternatives to tree injection. *J. Arboric.* 17, 217–226.
- Rioux, D., Chamberland, H., Simard, M., Ouellette, G.B., 1995. Suberized tyloses in trees: An ultrastructural and cytochemical study. *Planta An Int. J. Plant Biol.* 196, 125–140. <https://doi.org/10.1007/BF00193226>
- Shigo, A.L., 1984. Compartmentalization: A Conceptual Framework for Understanding How Trees Grow and Defend Themselves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 22, 189–214. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.22.090184.001201>
- Shigo, A.L., Money, W.E., Dodds, D.I., 1977a. Some Internal Effects of Mauguet Tree Injections. *J. Arboric.* 3, 213–220.
- Shigo, A.L., Shortle, W., Garrett, P., 1977b. Compartmentalization of discolored and decayed wood associated with injection-type wounds in hybrid poplar. *J. Arboric.* 3, 114–118.
- Smith, K.T., 2015. Compartmentalization, resource allocation, and wood quality. *Curr. For. Reports* 1, 8–15. <https://doi.org/10.1007/s40725-014-0002-4>
- Smith, K.T., Lewis, P.A., 2005. Potential concerns for tree wound response from stem injection, in: U.S.Department, of Agriculture, Forest Service, F.H.T.E. (Eds.), *Proceedings of the Third Hemlock Wooly Adelgid Conference*. Ashvill, NC, pp. 173–178.

Vandervoort C, V.A., 2014. Trunk Injection: A Discriminating Delivering System for Horticulture Crop IPM. Entomol. Ornithol. Herpetol. Curr. Res. 3, 1–7. <https://doi.org/10.4172/2161-0983.1000126>

Vek, V., Oven, P., Humar, M., 2013. Phenolic extractives of wound-associated wood of beech and their fungicidal effect. Int. Biodeterior. Biodegrad. 77, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.10.013>

Woodward, S., Pocock, S., 1996. Formation of the ligno-suberized barrier zone and wound periderm in four species of European broad-leaved trees. Eur. J. For. Path. 26, 97–105.

4. Résilience de la blessure d'injection chez la vigne

A l'instar de la partie précédente, la résilience de la blessure d'injection a aussi été évaluée sur des ceps de vigne. La structure du bois des espèces ligneuses diffère en fonction des espèces. La vigne étant une liane, son tronc est constitué de vaisseaux généralement plus longs et de diamètre plus large que chez les arbres (Ewers and Fisher, 1991). Inversement, le bois du pommier, dit à pores diffus, est constitué de vaisseaux plus courts et de plus faible diamètre (Hacke and Sperry, 2001; Aćimović *et al.*, 2014). Il était donc intéressant d'évaluer la blessure d'injection sur cette nouvelle espèce. En effet, comme l'arboriculture fruitière, la viticulture est à la recherche de solutions alternatives aux traitements phytosanitaires aériens. De plus, elle est confrontée au dépérissement des vignes dû aux maladies du bois pour lesquelles les solutions aériennes sont inefficaces.

4.1 Matériels et méthodes

4.1.1 Origine des troncs étudiés :

Les troncs sont issus de trois essais de traitement au phosphonate de potassium réalisés par micro-injection dans le cadre du projet Preamisse. Le premier essai, réalisé en 2015, consistait en l'injection de pieds de vigne du cépage Mauzac contre le mildiou pour évaluer l'efficacité de ce traitement. Dans le deuxième essai, réalisé en 2016, des vignes des variétés Fer Servadou, Duras, Muscadelle, Mauzac, Loin de l'œil et Syrah ont été injectées pour observer l'effet de la variété (le cépage) sur l'efficacité du traitement. Enfin, pour le troisième essai, réalisé en 2017, des ceps du cépage Loin de l'Oeil ont été injectés contre le mildiou. Les pieds ont été coupés le 12 février 2018. Deux pieds injectés en 2015 ont été coupés et ont permis l'analyse de 3 points d'injection. Huit points d'injections provenant de 5 vignes injectées en 2016 et 3 points de vignes en 2017 ont été observés. Les injections ont été réalisées avec le système Wegle Direct Inject® (ArborSystems LLC, NE, USA). Le diamètre des aiguilles était de 2 mm et la longueur de 1,3 mm.

4.1.2 Observations :

De la même manière que pour le pommier, il y a eu des observations externes de l'écorce avant la réalisation des coupes et des observations internes. Les coupes ont été réalisées et observées selon la même méthode que décrite dans l'article précédent. Toutefois, les analyses microscopiques avec le microscope à statif inversé n'ont pas été

nécessaires du fait de la grande taille des éléments conducteurs chez la vigne, de l'ordre de 0,5 mm.

4.2 Résultats

Les points d'injection des troncs de vigne ont été observés au cours des trois saisons suivant les injections : 7 mois (une saison de végétation, injection de l'année au printemps 2017), 19 mois (deux saisons de végétation, injection en 2016) ou 31 mois après l'injection (trois saisons de végétation, injection en 2015). Pour les points d'injection réalisés en 2016, la variabilité du temps de cicatrisation des échantillons et le faible nombre d'observations par cépage n'ont pas permis de mettre en évidence les différences entre les cépages. Les résultats des observations pour l'année 2016 ont donc été regroupés, indépendamment du cépage. Aucun cep n'a été impacté négativement par l'injection, il n'y a pas eu de pertes.

4.2.1 Observations externes de l'écorce

Contrairement aux pommiers, et en raison de la structure fibreuse de l'écorce de la vigne, qui se desquame régulièrement, l'observation de la surface du cep n'a pas permis après quelques mois de détecter facilement les sites d'injection. Pour voir les perforations, il a été nécessaire de peler la surface de l'écorce, mais il n'a pas été possible d'obtenir de mesures précises de la taille des trous puisqu'ils mesuraient moins de 2 mm de diamètre. 24% des ports d'injection présentaient des fissures verticales (25 points d'injection observés). En moyenne, ces fissures mesuraient $15,8 \pm 10,8$ mm de hauteur (n=6) (Figure 13).



Figure 13 : Photographies de sites d'injection 7 mois après injection (A) point d'injection normal (B) port avec une fissure, L= Longueur de la fissure. Barres d'échelle=5mm.

4.2.2 Structure interne de la blessure

Les observations internes ont montré que le processus de cicatrisation de la vigne était globalement le même que chez le pommier.

- Les observations en lumière visible montrent l'apparition d'une zone colorée au niveau de l'aubier dans l'axe de la perforation. La largeur de cette zone (à l'extrémité extérieure) varie de 2 à 7 mm et tend à diminuer au cours des années. Cette zone de bois colorée s'étend jusqu'à la moelle et a tendance à s'élargir dans les cernes les plus profondes, s'élargissant parfois un peu plus d'un rayon parenchymateux à l'autre (Figure 18 A). De nouveaux bois et liber, appelés bois de plaie, sont régénérés par le cambium et viennent boucher le trou d'injection en continuité des cernes développés post-injection (Figure 14 A). Dans l'aubier, les rayons parenchymateux de la zone colorée sont chargés en composés plus sombres. De plus, en bordure de la zone colorée, les vaisseaux de xylème sont bouchés par des thylls (Figure 14 C, D) ;
- Un des points les plus notables sur la vigne est la présence, dans de nombreux cas, d'un reste de morceau d'écorce adhérant plus ou moins au bois préexistant au moment de l'injection (Figure 14 A, B, et Figure 15), l'orifice d'injection restant alors visible (Figure 15 A). Ce morceau d'écorce peut ensuite être inclus dans le bois de plaie (Figure 15 B).

- Les observations macroscopiques en fluorescence mettent en évidence une assise subéro-ligneuse (ASL) qui apparaît la première année en bordure du bois de plaie (Figure 14 B). 7 mois après l'injection, cette ASL ne recouvre pas encore totalement l'ensemble des plaies. Une ASL est déjà présente à la surface du périderme et, entre le périderme et le tissu phloémien, au niveau des tissus sains. L'ASL consécutive à la blessure se met en place dans la continuité des assises existantes. Toutefois, la nouvelle assise est plus épaisse car elle est constituée d'un plus grand nombre de couches cellulaires (de 6 à 7).

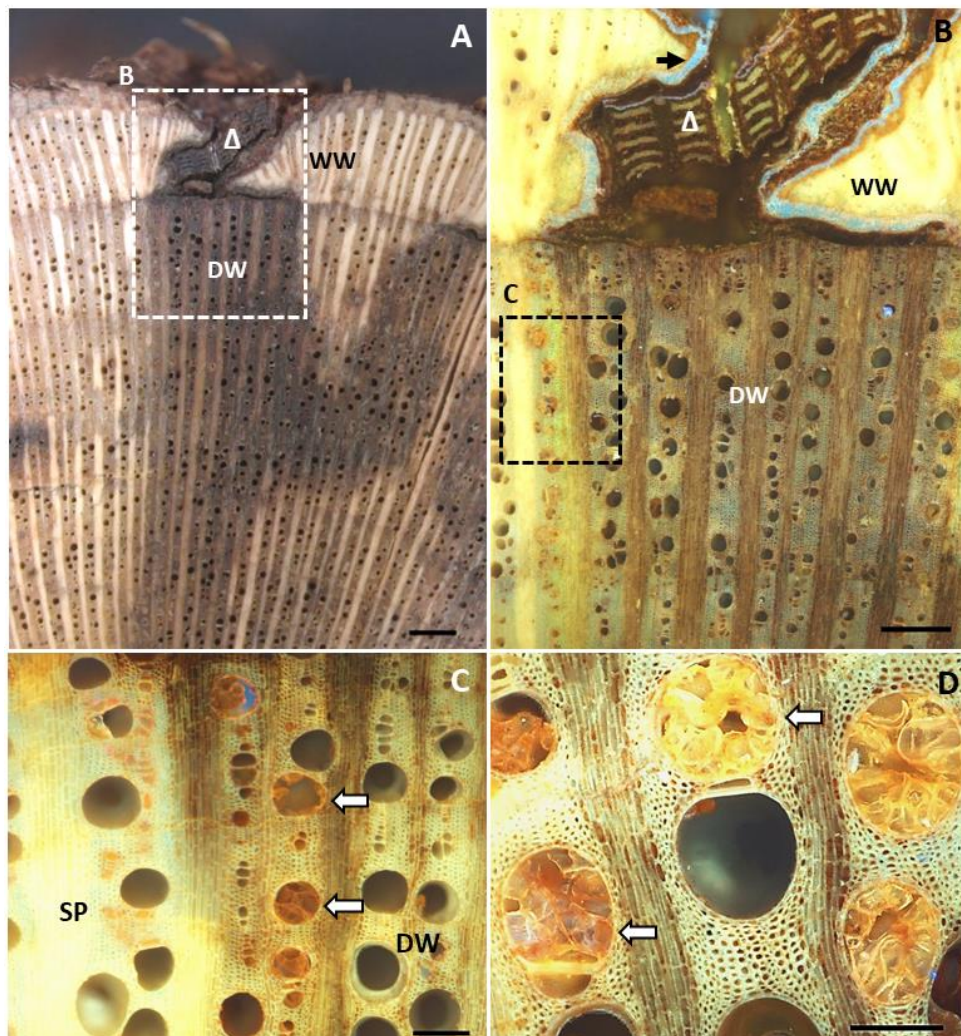


Figure 14 : Observations macroscopiques de coupes transversales de sites d'injection chez la vigne 19 mois après injection. (A) Coupe en lumière visible montrant la structure d'une blessure d'injection. Cette image montre la présence d'un morceau d'écorce adhérent au trou (triangle) et le bois de plaie (WW) qui s'est formé. Le bois présent dans l'axe de l'injection est coloré (DW). (B) Observation en fluorescence d'un agrandissement de la zone impactée par l'injection. Une assise subéro-ligneuse (flèche noire) apparaît autour du bois de plaie. (C) Zoom de la limite entre la zone de bois coloré (DW) et l'aubier normal (SP). Des thylls bouchent les vaisseaux à l'interface (flèches blanches). (D) Des thylls à la limite de la zone colorée (flèches blanches). Barre d'échelle : A=1 mm; B=0,5 mm ; C,D =0,2 mm.

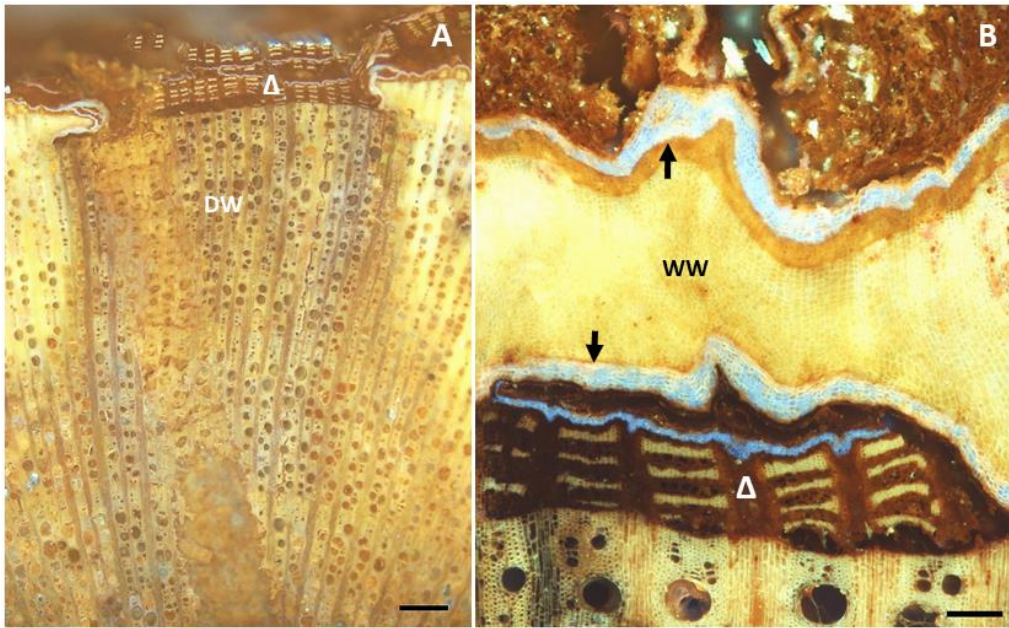


Figure 15 : Observations macroscopiques en fluorescence de coupes transversales de sites d'injection chez la vigne 19 mois après injection. (A) Cette image montre un morceau d'écorce adhérant au trou (triangle). La perforation est visible sur la partie gauche (B) Zoom de la zone de perforation. Un morceau d'écorce est inclus dans le bois de plaie (WW). Une assise subéro-ligneuse, qui était déjà présente au moment de l'injection, est visible à la surface de cette écorce. Une ASL (flèche noire) plus épaisse s'est aussi mise en place entre le morceau d'écorce et le bois de plaie. L'ASL entre le tissu phloémien et le périderme est également épaissie (flèche noire). Barre d'échelle : A=1 mm; B=0,2mm.

4.2.3 Temps de cicatrisation de la blessure

Les observations de coupes transversales ont permis de suivre l'évolution de la blessure à trois temps post-injection. De manière générale, la cicatrisation chez la vigne est assez longue, même après 31 mois de cicatrisation, les nouveaux tissus dans l'axe de la perforation ne sont pas encore fonctionnels car il n'y a pas encore formation de vaisseaux conducteurs (Figure 18).

Trois points d'injection ont été observés 7 mois après injection, c'est-à-dire après une saison de croissance du tronc suivant l'injection. L'assise subéro-ligneuse est en place (Figure 16 A, B). Toutefois, elle ne recouvre pas entièrement la surface du bois mise à l'air libre par la blessure et aucun trou n'est encore obturé. Du rhytidome est parfois présent au contact de la zone de bois coloré. Cette zone est entourée de vaisseaux obstrués par des thylls (Figure 16 A). Le bois de plaie se développe grâce à une reprise du fonctionnement du cambium vasculaire et il est complètement entouré par l'assise subéro-ligneuse.

Cependant, le cambium n'a pas encore retrouvé sa continuité et le bois de plaie, sans vaisseau xylémien, n'arrive pas à confluence dans l'axe de la perforation (Figure 16 B).

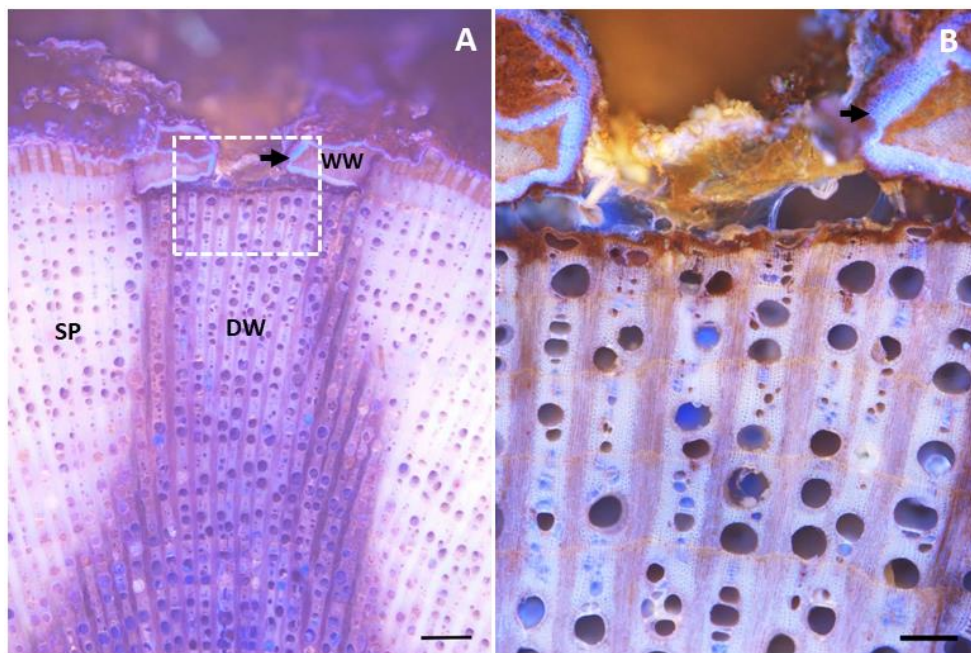


Figure 16 : Observation en fluorescence d'un point d'injection 7 mois après injection. (A) Une assise subéro-ligneuse (flèche noire) apparaît autour du bois de plaie (WW). Dans l'axe de la perforation l'aubier est coloré (DW). (B) Agrandissement de la perforation. Barre d'échelle : A= 1 mm ; B= 0,3 mm.

19 mois après injection, c'est à dire après 2 saisons de croissance, 8 ports d'injection ont été analysés. Dans 63% des cas, l'assise subéro-ligneuse est maintenant continue et dans 75 % des cas le trou est obturé par de l'écorce (Figure 17). Le cambium produit du bois de plaie mais le xylème reste perturbé :

- Dans 25% des cas, ce bois de plaie arrive à confluence (Figure 17B) ;
- Dans le reste des cas, le bois de plaie se forme mais n'est pas continu (Figure 17 A) ;
- Dans l'axe de la perforation, le tissu xylémien présent dans le bois de plaie n'a toujours pas retrouvé sa capacité de conduction de la sève car aucun vaisseau n'est formé (Figure 15B).
- Des morceaux de rhytidome sont encore présents au fond de la blessure. Le bois de plaie se développe alors soit en surface de ces morceaux, les incluant dans le bois, soit sous ces morceaux, les repoussant vers l'extérieur (Figure 14A ; Figure 15B).

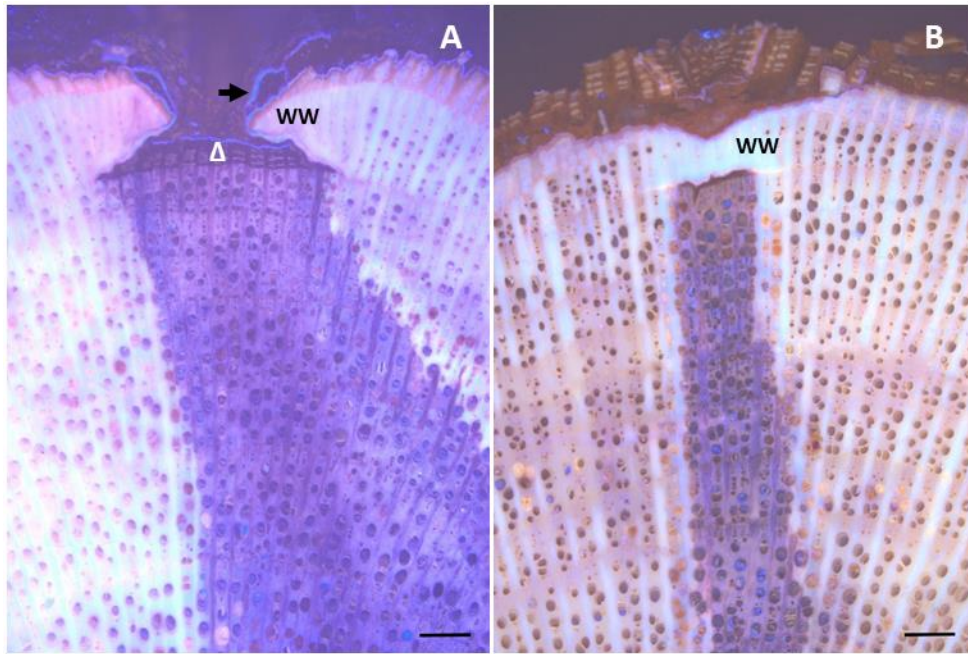


Figure 17 : Observations macroscopiques en fluorescence de coupes transversales de sites d'injection chez la vigne 19 mois après injection. (A) Point d'injection dont le bois de plaie n'a pas encore retrouvé sa continuité. Une assise subéro-ligneuse (flèche noire) ferme le trou. Du rhytidome d'écorce est présent dans le trou (triangle). (B) Point d'injection avec le bois de plaie (WW) qui forme un nouveau cerne continu. Barre d'échelle=1mm.

Trois blessures d'injection ont été évaluées 31 mois après injection, soit après trois saisons de croissance. L'ensemble des trous est comblé et isolé par une assise subéro-ligneuse continue et du bois de plaie. En périphérie de ce dernier, quelques vaisseaux de très faible diamètre commencent à apparaître. Comme précédemment, il y a une zone colorée dans l'aubier et les vaisseaux entourant cette zone sont bouchés par des thylls. Le phloème a une épaisseur plus faible et n'a pas retrouvé sa structure fonctionnelle dans l'axe de l'injection (Figure 18).

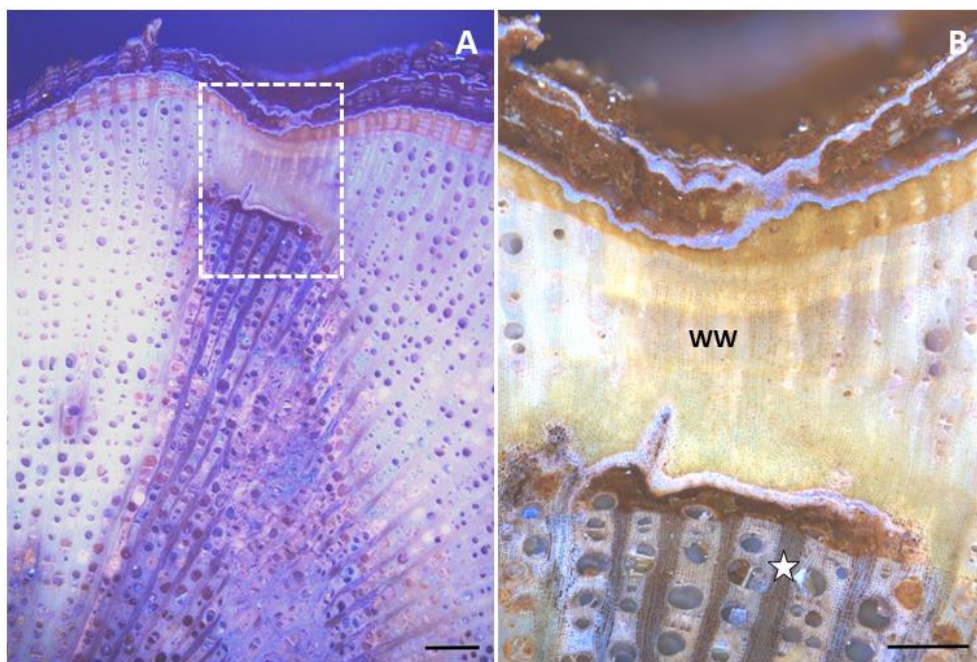


Figure 18 : Observations macroscopiques en fluorescence d'une coupe transversale d'une blessure 31 mois après l'injection (A) Le point d'injection est bien fermé. (B) Zoom du bois de plaie (WW) dans l'axe de la performance. Il n'y a que peu de vaisseaux formés. Les rayons ligneux sont chargés de composés foncés (étoile). Barre d'échelle : A=1mm; B=0,2mm.

Aucun signe de nécrose tissulaire ou d'invasion parasitaire n'est apparu à aucun des trois temps.

4.3 Discussion et conclusions

Les images réalisées ont permis de suivre la réponse de la vigne à la blessure d'injection pendant trois saisons de croissance après un traitement par micro-injection. Les résultats obtenus permettent de comparer la résilience des blessures chez la vigne à celles du pommier.

Dans le cas de la vigne, les observations externes sur l'écorce étaient moins représentatives de l'état réel de la blessure que chez le pommier. A cause de la desquamation naturelle de l'écorce des ceps de vigne (Aloni and Peterson, 1991), il était difficile de voir les trous à la surface de l'écorce, même en fin de saison, alors que la majorité des trous n'était pas encore fermés. La proportion de fissures observées sur la vigne est à peu près la même que chez le pommier, néanmoins les dimensions étaient un peu moindres (15,8 mm chez la vigne contre 20,2 mm chez le pommier).

De même que chez le pommier, aucune invasion de pathogène n'a été identifiée dans cette étude, même s'il est souvent reporté que la blessure d'injection peut être une porte d'entrée pour les pathogènes (Perry *et al.*, 1991; Ferracini and Alma, 2008; Acimović *et al.*, 2016). Il semblerait donc que, malgré un temps de cicatrisation plus long que chez le pommier, la mise en place des barrières soit suffisante pour bloquer une invasion par des pathogènes.

Les observations internes de blessures sur la vigne montrent la présence de rhytidomes dans les plaies alors que cela n'est jamais observé chez le pommier. Lorsque le bois de plaie se forme et vient obturer le trou, ce morceau de rhytidome est repoussé vers l'extérieur, ou parfois, inclus entre deux cernes d'aubier. Bien qu'une assise subéro-ligneuse se mette en place, elle ne constitue pas, contrairement au pommier, une barrière continue vis-à-vis de l'extérieur. Le bois anciennement formé ou le rhytidome restent exposés à l'air plus longtemps que chez le pommier. Cette assise est constituée d'un plus grand nombre de couches cellulaires chez la vigne et semble se développer de manière moins bien structurée que chez le pommier. De plus, elle apparaît en surface de la plaie alors qu'elle se développe, en accord avec les travaux de Biggs (1986) en profondeur de l'écorce chez le pommier.

De plus, une zone colorée apparaît dans l'aubier touché par l'injection et les vaisseaux de xylème à la limite de cette zone sont bouchés par des thylls. Les thylls vont ainsi créer une barrière empêchant la dissémination verticale de possibles pathogènes (Morris *et al.*, 2016). La zone colorée est caractérisée par une forte concentration en polyphénols dans le xylème et les rayons (Eyles, Davies and Mohammed, 2003; Vek, Oven and Humar, 2013; Smith, 2015). Ces polyphénols forment une barrière chimique étanche contre les pathogènes, évitant aussi la dessiccation de l'aubier adjacent à la zone directement impactée par l'injection (Vek, Oven and Humar, 2013; Morris *et al.*, 2016). Contrairement à ce qui est observé chez le pommier, cette zone colorée est, chez la vigne, beaucoup moins bien délimitée par les rayons parenchymateux, tendant à s'élargir dans les cernes les plus profonds. La compartimentation par ces rayons semble donc moins efficace chez cette espèce.

Chez les deux espèces, un cal de bois de plaie se développe, obturant finalement le trou d'injection. Ce bois de plaie commence à se former à partir du cambium dès la première année, mais chez la vigne, il n'arrive à confluence qu'à partir de la seconde année de croissance post-injection. Après trois saisons de croissance, les trous sont complètement

bouchés et le cambium a donc retrouvé sa continuité. Toutefois, même après ce laps de temps, le xylème et le phloème formés n'ont pas retrouvé leur structure normale et par conséquent leur fonctionnalité de transport. Ce mécanisme est donc plus efficace chez le pommier puisqu'il ne nécessite en général qu'une année de croissance pour obturer la totalité des trous et seulement deux pour retrouver un cerne avec une structure normale contenant des vaisseaux xylémiens correctement formés en taille et en nombre. Le manque de vaisseaux dans l'axe de la perforation ne permettra pas la circulation de la sève dans cette zone, même en troisième année chez la vigne. Toutefois, la zone impactée reste de relativement faible amplitude.

Etant donné cette cicatrisation plus lente même lors d'une micro-injection, il serait important de limiter le nombre de ports d'injection par cep pour que cette méthode puisse être viable dans le temps en viticulture. De surcroît, ces observations amènent à proscrire d'autant plus les méthodes d'injection avec un perçage au foret ou avec des aiguilles de larges diamètres.

5. Conclusions du chapitre

Ces deux études ont montré qu'après l'injection, le pommier et la vigne mettaient en place des barrières physiques et chimiques pour fermer la blessure d'injection et éviter l'entrée de pathogènes. Dans le cas des deux espèces, les phénomènes suivants ont pu être observés (Figure 19) :

- Il n'y a pas eu d'impact négatif de l'injection sur la santé générale de l'arbre vis-à-vis de l'entrée de pathogènes ;
- Le volume de bois impacté par la blessure est faible à très faible, affectant probablement peu le flux de circulation de la sève xylémienne ;
- Une assise subéro-ligneuse s'est mise en place plus ou moins rapidement selon les espèces au niveau de l'écorce pour isoler le bois de l'environnement extérieur ;
- Une zone colorée constituée de dépôts de composés phénoliques apparaît au niveau de l'aubier dans l'axe de la perforation ;
- Les vaisseaux entourant cette zone sont bouchés par des thylles qui accroissent la compartimentation ;

- Les rayons ligneux chargés en composés phénoliques forment une barrière latérale ;
- De nouveaux tissus conducteurs sont générés avec des vaisseaux fonctionnels qui apparaissent au cours du temps, variable selon l'essence ;
- Les cernes présents lors de l'injection sont isolés des nouveaux cernes par une discontinuité dans l'ordonnancement des tissus formant une barrière radiale. La continuité est rompue d'une part, par une barrière physique avec un parenchyme xylémien contenant peu d'éléments conducteurs et une rupture de la continuité des rayons parenchymateux et d'autre part, par une barrière chimique formée par les dépôts phénoliques.

Ces différentes barrières sont en accord avec le modèle de CODIT (Shigo, 1984) et correspondent aux différentes parois qui sont décrites dans ce modèle. Il s'agit donc de phénomènes normaux de réponse à une blessure.

Chez le pommier, les ports d'injection sont obstrués entre la première et la deuxième année (année de l'injection incluse). Après trois saisons de croissance, les nouveaux cernes redeviennent fonctionnels avec la présence de vaisseaux intacts. En revanche, chez la vigne, la cicatrisation fait dans l'ensemble appel aux mêmes phénomènes, mais avec des délais plus longs. A la fin de la première année, les ports d'injection ne sont pas fermés. La fermeture du trou s'effectue lorsque le nouveau xylème et le cambium arrivent à confluence, au bout de la deuxième et de la troisième saison.

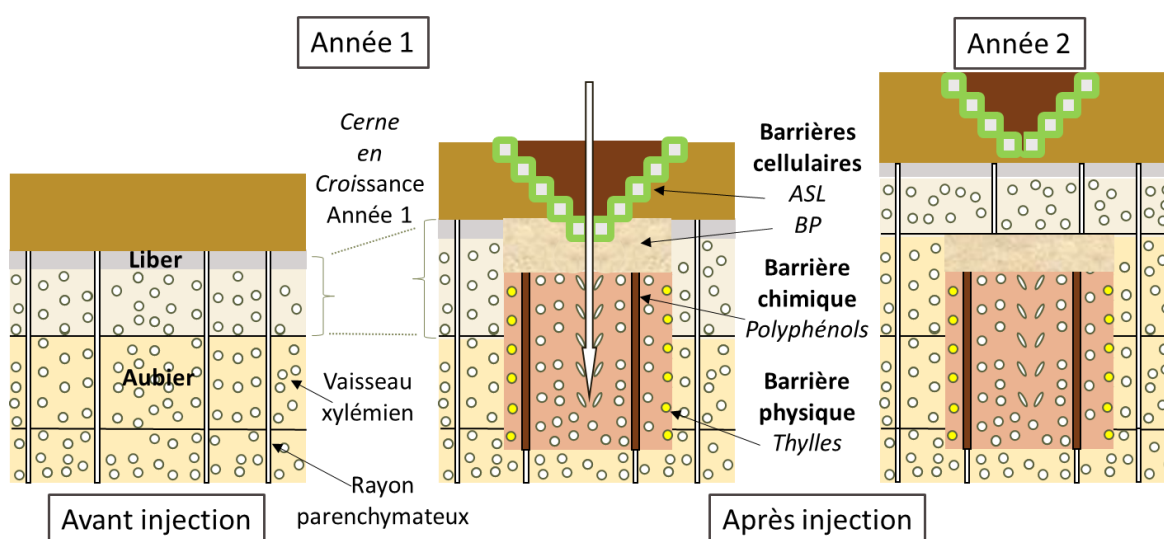


Figure 19 : Schéma d'évolution d'une blessure d'injection montrant les différentes modifications tissulaires au niveau de l'écorce et du tissu xylémien. ASL=Assise subéroligneuse ; BP=Bois de plaie.

La micro-injection à l'aide d'une aiguille de faible diamètre limite ainsi la blessure causée à l'arbre et n'a pas d'impact négatif sur sa santé. Lorsque la cicatrisation est rapide et les perforations comblées totalement, comme chez le pommier, cela rend cette méthode pérenne et réutilisable plusieurs fois dans l'année. Il sera même probablement possible de réinjecter dans la même zone après quelques années, puisque toutes les structures tissulaires sont remises en place correctement et que le cal de cicatrisation ne déforme pas les cernes suivants. Par contre, chez la vigne cette méthode pose plus de problèmes de durabilité et ne semble pouvoir être utilisée que parcimonieusement au cours des années.

Enfin, il serait intéressant d'observer des ports d'injection sur des espèces ligneuses possédant une anatomie du xylème différente, tel que les espèces à bois poreux ou les conifères ou chez d'autres lianes.

CHAPITRE 3 : DISTRIBUTION DES SUBSTANCES ACTIVES DANS LE HOUPPIER ET PERSISTANCE DU TRAITEMENT

1. Introduction

Après injection dans le tronc, les substances actives sont transférées du tronc vers le houppier de l'arbre. Pour que le traitement par injection soit efficace, il faut que les produits injectés se répartissent dans le houppier et entre en contact avec la cible visée, champignon ou insecte par exemple. Pour cela trois points sont importants :

- Une concordance entre la période de présence de la maladie ou du ravageur et la survenue de la substance active dans le houppier ;
- Une répartition homogène de la substance active dans le feuillage ;
- Une concentration effective suffisante.

Ces trois points sont en lien avec la distribution spatiale et temporelle des substances actives dans les arbres (Cowles, Montgomery and Cheah, 2006; Doccola *et al.*, 2007; Mota-sanchez *et al.*, 2009; Dilling *et al.*, 2010; Tanis *et al.*, 2012). A ces préoccupations phytosanitaires s'ajoute une dimension environnementale : les substances actives doivent être transférées dans les feuilles, cependant elles peuvent aussi être transportées vers les fleurs et la faune adventice qu'il faut protéger (Coslor, Vandervoort and Wise, 2019). D'autre part, plus spécifiquement en arboriculture fruitière, il faut éviter la présence de résidus au-delà des limites maximales de résidus (LMR) dans les fruits lors de la récolte. Ceci est une problématique commune à tout traitement phytosanitaire. Toutefois, l'injection par sa dimension systémique rajoute une préoccupation dont il faudra tenir compte (Byrne *et al.*, 2012).

Le calendrier de traitement et sa persistance ont donc un rôle important à jouer pour arriver à cet objectif. D'autres facteurs liés à l'injection, à l'anatomie de l'arbre, aux produits injectés ou aux conditions environnementales vont aussi affecter la distribution comme cela a été abordé dans le chapitre 1. La dynamique temporelle, c'est-à-dire le temps pour atteindre le houppier et la persistance de la molécule dans le feuillage, va être influencée par les caractéristiques des molécules et de leur formulation dans l'injectât ainsi que par les conditions environnementales. La durabilité du traitement peut venir d'un transfert progressif de la substance active depuis le site d'injection ou de la clairance de la molécule dans le feuillage, liée à la dégradation métabolique ou à une compartimentation foliaire des molécules, ou à la physiologie de l'arbre traité. Ainsi, les travaux de Doccola *et al.* (2012) ont montré une efficacité de trois ans après l'injection d'imidaclopride dans

la pruche du Canada (*Tsuga canadensis*), pour lutter contre le puceron lanigère de la pruche (*Adelges tsugae*).

La dynamique spatiale est plutôt liée à l'anatomie de l'arbre et de son système vasculaire. La plupart des espèces possèdent un flux de sève sectorisé, c'est-à-dire que chaque vaisseau irrigue une partie définie de l'arbre. A cause de cette sectorisation, l'injectât peut rester très localisé pendant son transfert avec une faible distribution latérale, entraînant une distribution hétérogène des composés dans le feuillage (Orians *et al.*, 2004; Zanne, Sharma and Orians, 2006; Byrne *et al.*, 2012; Tanis *et al.*, 2012; Hu and Wang, 2016). De plus, le trajet de la sève ou plutôt la forme des faisceaux xylémiens peut présenter différents schémas. Par exemple, Tanis *et al.* (2012) ont reporté un flux en zig-zag chez le frêne après injection. D'autres essences ont un flux en spirale comme il a été rapporté chez le pommier, le pin rouge du Japon ou l'orme (Chaney, 1986; Takai, Suzuki and Kawazu, 2003; Acimović *et al.*, 2014). Cette hétérogénéité de distribution et sa sectorisation sont contrées en pratiquant plusieurs points d'injection sur le pourtour du tronc (Tanis *et al.*, 2012). Acimović *et al.* (2014) a ainsi trouvé un optimum de 4 ports d'injection sur des pommiers dont le tronc mesure 28 cm dbh pour un traitement à l'imidaclopride. Hu and Wang (2016) conseillent 2 points d'injection sur des orangers de 9 cm de diamètre (en dessous de la greffe) pour un traitement à l'oxytétracycline. La distribution et le nombre de points d'injection qui en résulte dépendent donc en partie de l'anatomie de l'arbre et du diamètre de tronc.

La problématique des résidus dans les fleurs et les fruits après l'injection que pose la systémie du traitement par injection a été peu étudié (Byrne *et al.*, 2012; Vanwoerkom, 2014; Coslor, Vandervoort and Wise, 2019). Les quelques études qui ont abordé ce point ont montré que les niveaux de résidus dans les fruits étaient généralement très faibles et bien au-dessous des LMR des Etats-Unis à la récolte (Hu, 2016 ; VanWoerkom, 2014 ; Byrne, 2012).

Connaître la distribution de composés avec des caractéristiques physico-chimiques différentes dans les mêmes arbres devrait permettre d'établir les bases d'un traitement, à savoir :

- La dose à injecter pour obtenir des concentrations efficaces dans les feuilles ;
- Le nombre de ports d'injection pour parvenir à une homogénéité du traitement dans le houppier ;

- Le moment auquel injecter la substance active pour coïncider avec la présence de la cible ;

et permettre de gérer le risque de résidu dans les fruits ou les fleurs.

Le premier objectif de ce chapitre était de déterminer le taux de transfert, la distribution et la persistance du traitement avec de l'imidaclopride, du pyriméthanile et du difénoconazole à partir d'un point d'injection afin d'évaluer la qualité de la couverture fournie par un traitement avec ces molécules de lipophilies différentes. Le deuxième objectif était de vérifier l'innocuité sanitaire des fruits à la récolte.

2. Article 3 : Analyse pharmacocinétique de la dynamique spatio-temporelle dans les feuilles de pommier de l'imidaclopride, du pyriméthanil et du difénoconazole injectés dans le tronc

Article 3 : Pharmacokinetic analysis of spatio-temporal dynamics in apple tree leaves of trunk injected imidacloprid, pyrimethanil and difenoconazole

Article en préparation pour soumission dans *Pest Management Science* prévue fin octobre

Berger C., Mediouni L., Chevolleau S., Bouville A., Martin J.F., Laurent F.*

Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

Corresponding author: François Laurent, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

E-mail: francois.laurent@inra.fr

Phone: +33(5)82066357

RESUME

La pulvérisation aérienne de produits phytosanitaires est la méthode d'application la plus courante pour la lutte contre les bioagresseurs sur les arbres. Cependant, la pulvérisation entraîne d'importantes pertes par dérive dans l'environnement. L'injection de substances actives dans le tronc des arbres est une méthode de traitement alternative qui permet de supprimer ce risque. Cependant, l'efficacité du traitement peut être variable et des difficultés peuvent être rencontrées pour obtenir un traitement homogène. Nous avons étudié la distribution et la cinétique de l'imidaclopride, du pyriméthanil et du difénoconazole dans le feuillage de pommiers après injection dans le tronc. Le risque de résidus dans les fruits au moment de la récolte a aussi été évalué.

Le transfert de l'imidaclopride vers les feuilles était plus élevé que celui des autres matières actives (coefficient de transfert apparent, $TC_{app} = 2-24, 1,3$ et $<1 \text{ \%}.g^{-1}$ pour l'imidaclopride, le pyriméthanil et le difénoconazole) et plus rapide, tandis que les concentrations de difénoconazole retrouvées étaient très faibles. Le pyriméthanil présentait des résultats intermédiaires. La distribution des substances actives est très hétérogène dans le feuillage et dépend de l'emplacement du site d'injection. De plus, une grande variabilité de la récupération de l'*ai* a été mesurée dans la couronne, comme le montrent les concentrations ou l'aire sous la courbe avec un coefficient de variation élevé ($>100\%$). Une analyse non-compartmentale des données a été effectuée afin de déterminer les paramètres phyto-pharmacocinétiques pour comparer les substances actives. Finalement, seuls des résidus de pyriméthanil ont été détectés dans les fruits, mais toujours bien en dessous des limites maximales de résidus (LMR).

Cette étude a démontré que la distribution des produits phytopharmaceutiques après injection dans le tronc dépend fortement de la lipophilie de la matière active. Par analogie avec les études PB-PK (Physiologically based pharmacokinetic) chez l'homme et l'animal, nous avons proposé d'analyser la cinétique de distribution de substances actives dans l'arbre à l'aide d'un modèle monocompartimental, semblable à l'absorption *per os* du médicament. Cela permet de comparer les méthodes de traitement ou les principes actifs et les préparations.

ABSTRACT

Background: Aerial spraying of plant protection products is the most common application for pest management in trees. However, spraying lead to extensive pesticide drift losses. Injection of active ingredients into the trunk of trees is a more preservative alternative-method for environmental safety. However, the treatment efficacy can be variable and difficulties can be encountered to obtain homogeneous treatment. We investigated the distribution and kinetics of imidacloprid, pyrimethanil and difenoconazole in apple crown after trunk-injection.

Results: Imidacloprid transfer to the crown was higher than both other active ingredients (*ai*) (Apparent transfer coefficient, $TC_{app} = 2-24, 1,3$ and $<1 \text{ \%}.g^{-1}$ for imidacloprid, pyriméthanil and difénoconazole respectively) and faster, while difenoconazole recovery was very weak. Pyrimethanil presented intermediate results. The

distribution of *ai* was very heterogeneous in foliage and depended on the location of the injection site. Moreover, high variability of *ai* recovery was measured in crown, as determined by concentrations or by area under the curve with high variation coefficient (>100%). A non-compartmental analysis of data was made to determine phyto-pharmacokinetic parameters for comparison of *ai*. Only pyrimethanil residues were detected in fruits but always far below the maximum residue limits (MRLs).

Conclusion: This study demonstrated that distribution of plant protection products after trunk injection is highly dependent on the lipophilicity of the active ingredient. By analogy to PB-PK (Physiologically based pharmacokinetic) studies in humans and animals, we proposed to analyse kinetics of *ai* crown distribution with a mono-compartment model, similar to *per os* absorption of drug. This allows the comparison of treatments methods or active ingredients and preparations.

KEYWORDS: trunk-injection, plant protection products, spatial and temporal distribution, Phyto-pharmacokinetics, apple tree.

INTRODUCTION

In conventional agriculture, spaying of plant protection products is largely used. The dispersion in atmosphere of these chemicals lead to side effects for human health and environment. Recently an effort is done to attain pest management systems more environmentally compatible and safer for workers and consumers. These changes are especially needed in tree fruit agriculture where pesticides are repeatedly used to control pests and diseases (Aćimović et al., 2014; Pertot et al., 2017). The main method of pesticides application in tree is foliar spray, but this technology has a number of disadvantages, such as environmental drift, applicator and neighbour exposure and difficulties in reaching the target when the trees are too large, such as in chestnut and walnut orchards or in forest trees (Wise et al., 2014). The soil drench is another application method to treat trees but this method also presents a high risk of drift-losses in the environment and its efficacy is also limited by degradation in the soil (Fettig et al., 2013; Hu and Wang, 2016). In addition, in some countries, legislative restrictions on the use of pesticides have led to the limitation or elimination of their use. Novel application

technologies need to be developed to replace these conventional treatment methods. Among these, trunk injection appears to be a sustainable approach for pest control in tree (Fettig et al., 2013; Vandervoort C, 2014; Wise et al., 2014) .

Trunk injection is a tree care method, target precise, allowing to deliver plant protection products directly inside the xylem tissue. The compounds are transported to the foliage and distributed throughout the crown by the transpiration stream. Therefore, trunk injection is an environmentally friendly method because no chemicals are dispersed in atmosphere during application. This method is used to fight against insects, nematodes, fungi, bacteria and phytoplasma (Aćimović et al., 2015; Byrne et al., 2012; Percival and Boyle, 2005). Trunk injection has been shown to be valuable to control invasive pest species such Emerald ash borer and Hemlock woolly adelgid in the USA (Docola et al., 2011, 2007; Flower et al., 2015). In an agricultural context, injection have shown good results against Citrus Huanglongbing (*Candidatus liberbacter* Garnier) and Fire Blight (*Erwinia amylovora* Burriel) in apple trees (Aćimović et al., 2015; Hu and Wang, 2016).

Efficiency of trunk injection depends on numerous factors such as physico-chemical properties of compounds, tree physiology and anatomy, method of injection, environmental conditions and target (Berger and Laurent, 2019; Percival and Boyle, 2005; Sanchez-Zamora and Fernandez-Escobar, 2000) . The choice of the product injected is crucial since it must be effective against the target but also well translocated from trunk to foliage. The most important factors directly related to the chemical itself are lipophilicity and polarity (Briggs et al., 1982). Pesticides formulated for spraying are not necessarily suitable for injection, therefore formulation for injection can improve their transfer (Aćimović et al., 2014; Hu and Wang, 2016).

The distribution is largely determined by xylem anatomy. Sectorial sap flow can lead to an uneven distribution in the canopy. Every xylem vessel is connected to a specific zone in the tree, thus compounds are distributed by a sectorial flow, inducing a variable control effect (Byrne et al., 2012; Hu and Wang, 2016; Oriens et al., 2004). Number of injection can be adjusted to cover the entire foliage. Moreover, the injection date must be chosen to match the arrival of the chemical in foliage with pest pressure. Most studies focus on the efficiency of trunk injection but little studies have investigated the temporal dynamics and the spatial distribution of chemicals in the foliage (Aćimović et al., 2014; Byrne et al., 2014; Hu and Wang, 2016; Tanis et al., 2012). Main difficulties encountered with trunk

injection are the heterogeneous distribution in the tree and therefore the lack of efficiency. For example, (Aćimović et al., 2014) showed a heterogeneous distribution of the imidacloprid under four injection ports.

Apple orchards is one of the most treated fruit production even if integrated pest management (IPM) has been developed since the 1970s in Europe and despite the resistant cultivars. Trunk injection is therefore a method of interest to reduce side effects of chemicals used; however, does this systemic treatment not bring more risk of finding residues in fruits above the MRLs?

Studies have investigated residues in apple fruits after injections of various insecticides such as imidacloprid or emamectin benzoate. Residues found were below the U.S. Maximum Residue Levels by the end of the season (Coslor et al., 2019; Vanwoerkom, 2014)

The main objective of this study is to compare the kinetics and the distribution of three chemicals, imidacloprid, pyrimethanil and difenoconazole, after trunk injection in apple trees. All three were chosen to represent a large range of lipophilicity. The relationship between the distribution area of chemicals in the foliage and the position of the injection point was evaluated. Beside that, fruit residues were determined to assess the safety risk at the harvest. *In fine*, we proposed a pharmacokinetic analysis of these data.

MATERIALS AND METHODS

Field site

This experiment has been conducted in an apple orchard in Corbarieu (France) in 2017. These 25 years old trees were of the ‘Canada Reinette’ cultivar. Apple trees were goblet pruned with three primary branches (PBs). The 12 more similar trees in size and structure were selected. The orientations of the PBs was the same between all the trees.

Trunk injection

These trees were trunk-injected in June 2017, with three active ingredients (*ai*), imidacloprid (20 mg *ai*/mL), pyrimethanil (10 mg *ai*/mL) and difenoconazole (16 mg *ai*/mL). The formulations were trunk injected using the Wedge Direct Inject®

(ArborSystems LLC, NE, USA) to deliver a dose of 1 mL. The 2 mm diameter needle was inserted into the xylem, without drilling, to a depth of 10 mm. The three *ai* were injected in the center of PBs by performing one injection per PB in three trees for each *ai*. On trees center injected with both other *ai*, imidacloprid was also injected in the right or left side of PBs (Figure 1).

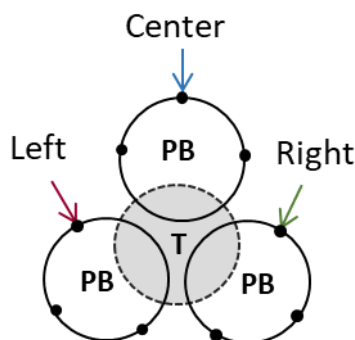


Figure 1: Location of injections in the base of the primary branches (PB). The three *ai* were injected in the center. Imidacloprid was also injected in the left and right sides. T= trunk.

Leaf and apple sampling

Each PB was divided in six sectors to evaluate the spatial distribution. The six sectors were created by horizontally separating the PB with the upper and the lower leaves, and vertically with three sectors at the right, middle and left side (standing in front of the PB) (Figure 2).

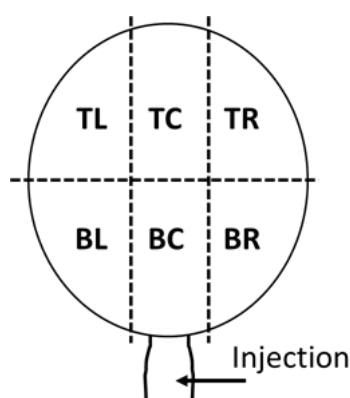


Figure 2: Primary branches division for leaf sampling. T, top sectors; B, bottom sectors; L, left sectors; C, center sectors; R, right sectors.

Twenty leaves were sampled by sector. These samples were repeated at four time points: 7, 20, 41 and 62 days after injection (DAI). Four apple fruits were sampled

according to the same sectors but at only one time point, 41 DAI, that corresponded to the harvest time.

Residue analysis

Chemicals and reagents

LC-grade acetonitrile was acquired from Fisher Scientific (Illkirch, France). All solutions were prepared with Ultrapure water from a Milli-Q water purification system (Millipore, St-Quentin-en-Yvelines, France). Formic acid was obtained from VWR (Radnor, PA, USA). Pesticides standards (imidacloprid, pyrimethanil, difenoconazole) and the internal standard (IS: epoxyconazole) were obtained from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France).

Sample preparation

The modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) method extraction have been used to samples preparation. Leaf samples were homogenized by using a blender. 5 g of leaf sample were weighted into a 50 mL of polypropylene tube. 12,5 mL of water and 10 mL of acetonitrile were added before the sample was vortexed. The QuEChERS extraction mix II (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was introduced into the centrifuge tube. After, the mixture was shaken for 1 min and centrifuged 5 min at 3,700 rpm, an 8 mL supernatant aliquot was transferred into the dispersive SPE dispersive kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The tube was mixed vigorously 1 min by vortex and centrifuged 5 min at 3700 rpm. 1 mL of acetonitrile layer was filtered on a 0.22 µm filter membrane and analyzed by LC-MS/MS.

LC-MS/MS analysis

Each sample extract was analyzed by a liquid chromatography system (Thermo corporation) coupled to a mass spectrometer detector (Thermo, Quantum). Chromatographic separation was achieved on a nucleodur C18 gravity column (100×2.0 mm, 3 µm particle size, Macherey-Nagel) at 30°C. The mobile phase was a mixture of acetonitrile/water (95/5) with 0.1% of formic acid (A) and water with 0.1% of formic acid (B). The gradient elution employed was summarized in the table 1.

Table 1: Parameters of time planning of LC-MS/MS gradient of active ingredient chromatography.

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Flow rate ($\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$)
0.00	75	25	250
5.29	10	90	
13.00	10	90	
13.40	75	25	
20.00	75	25	

The ions were produced by using electrospray ionization source, and were monitored in positive MRM mode. The transitions used for quantification of imidacloprid, pyrimethanil and difenoconazole were respectively 209.2, 107.2 and 251.1 m/z .

The limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) of each *ai* were described in table 2.

Table 2: Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the three active ingredients.

	LOD	LOQ
Imidacloprid	0,0109	0,036
Pyrimethanil	0,0003	0,001
Difenoconazole	0,0003	0,001

Statistical analysis

For imidacloprid and pyrimethanil, analysis of variance on repeated measures using mixed model was used to take into account the sampling time factor. The ANOVA model included also the injection port location, the sector height and laterality as fixed factors. Considering the distribution of the data, values were log10 transformed. Distribution of residuals was considered to check their normality. A standard ANOVA was also carried out for each sampling time including the same fixed factors. A factor with a p-value lower than 0.05 was considered as significant.

Pharmacokinetic analysis

Data were analysed with non-compartmental model. AUC (area under the curve) and AUMC (area under the moment curve) of *ai* in each sampling sector from $t=0$ to $t=62$ DAI (AUC_{0}^{62}) and k_e , elimination constant were calculated with the software GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Only k_e with regression coefficient higher than 0.7 were retained. AUC 0 to infinite, AUC_{0}^{∞} , were calculated by adding AUC_{0}^{62} and AUC_{62}^{∞} . These last were calculated by the ratio C_{last}/k_e with $C_{last}=62$ DAI concentration. AUMC were calculated in similar way.

Half-life, $t_{1/2}$, were calculated from equation: $t_{1/2} = \ln 2/k_e$.

Apparent transfer coefficient, TC_{app} , were calculated from equation: $TC_{app} = \frac{C}{D_o} \cdot 100$, expressed in $\% \cdot g^{-1}$, where C was the mean concentration of one PB and D_o was the injected dosage.

Mean residence time were calculated from the equation: $AUMC/AUC$.

RESULTS

Tree injections were performed on primary branches (PBs) of goblet-pruned apple trees. Currently, the apple trees are rather pruned on a single axis. For this study, each PB was considered as a trunk axis. However, because of goblet shape, PBs have an inner face devoid of secondary branches and leaves. As a result, PBs have a right side and a left side, form the outside of the tree.

Distribution kinetics

Each PB of each tree received one injection of a different *ai*, injected into the center of the PB base. The three compounds did not have the same distribution both in terms of kinetics and in terms of leaf concentrations. The highest concentrations were obtained after imidacloprid injection, and the maximum imidacloprid concentrations ($3.34 \pm 2.4 \mu g/g$) were recovered at 20 days DAI. Then, the imidacloprid concentrations decreased (Figure 3). Little or no difenoconazole were found regardless of the time and area of foliage considered. The third *ai*, pyrimethanil, was detected at lower leaf concentrations than imidacloprid and, pyrimethanil peak concentration was lasted at 41 days.

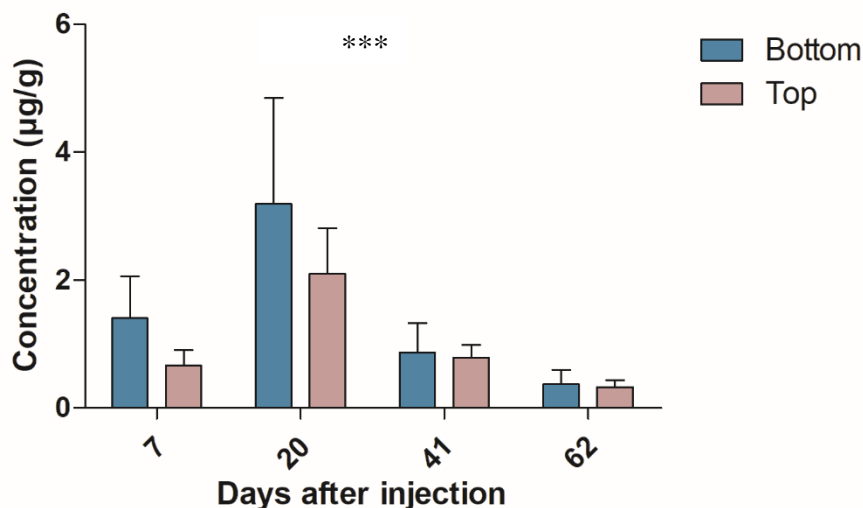


Figure 3: Concentration in leaves at each sampling time after injection of imidacloprid in the center, according to the height of the leaves. *** indicates the significantly different sampling time (p -value < 0.001). Error bars represent the standard error of the mean (SEM).

Spatial-distribution

The experimental setup allowed testing the influence of various parameters on the three *ai* distribution in the crown, such as the injection port location, the sampling time, the PB orientation and the sector height or laterality. Independently of the other factors, imidacloprid concentrations depended on sampling time. In addition, there was an effect of the port location, sector height and sector laterality but with significant interactions between them. As the orientation of PB, according to cardinal points, did not have shown a significant effect on the leaf concentrations, the subsequent statistical analysis were batched independently of the orientation. With pyrimethanil, no significant effect was identified. As difenoconazole concentrations were, most of the time, not detected or under the LOQ, no analysis on the distribution was possible.

Distribution of imidacloprid when injected in the center of the primary branches

The data showed a very high variability in the imidacloprid distribution between the different sectors in the crown but also between repetitions for a same sector. At, 20 DAI, concentrations were dispersed from 0 to 28 µg/g of leaves, with a third of sampling under

LOQ. The figure 4 showed a scatter plot of imidacloprid concentrations in the six sectors of branches at 20 DAI.

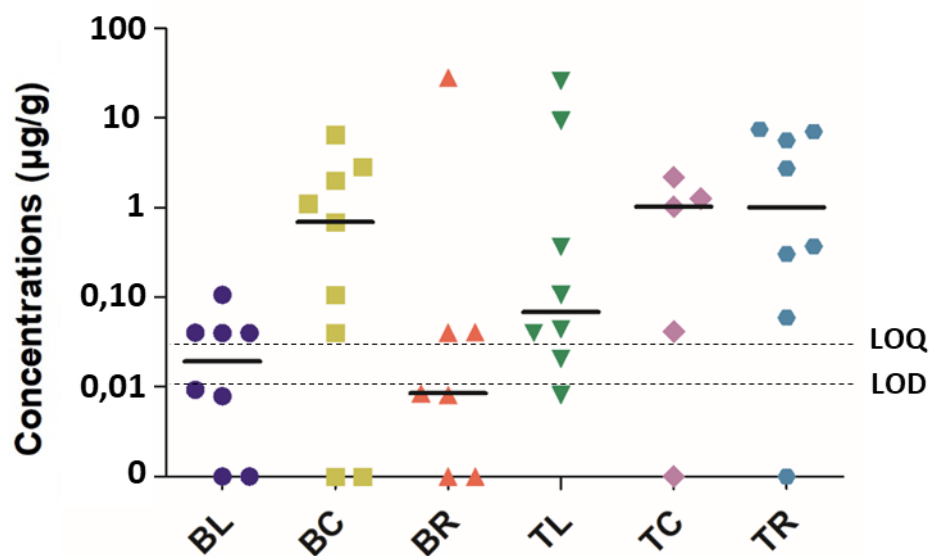


Figure 4: Concentrations in a logarithmic scale according to the sectors, after an injection of imidacloprid in the center of primary branches. B = bottom, T = top and L = left, C = center, R = right. Horizontal bars indicate the median values.

The variability was also visible between trees. Imidacloprid was detected in all sectors of two trees, with similar average concentrations, 2.60 ± 6.97 and 2.64 ± 6.83 µg/g, respectively. That represented a variability of 268% with values dispersed from LOD, for the half, to 28.15 µg/g. Higher or lower concentrations were not always in the same sectors. In contrast, imidacloprid transfer in the third tree was highly different with no imidacloprid recovered in most of the sectors. Only four sectors had concentrations higher than LOQ and in most sectors, imidacloprid was not detected.

Pyrimethanil distribution after a center injection

At 7 DAI, the most concentrated sector of central pyrimethanil-injection points was the bottom right. Concentrations in the other quadrants were very low. At 20 DAI, the concentration continue to increase in the bottom right sector, and pyrimethanil appeared in the left and central top sectors. At 41 DAI, the concentrations have continued to increase and the same zones were the most concentrated. In the last date, 62 DAI, concentrations have decreased in all sectors.

Distribution of imidacloprid according to the injection site location

In order to compare the influence of the injection port location and tree pruning on the *ai* distribution, injections were performed in the left and right side of PBs with imidacloprid, which was the better transferred *ai*. This assay was not done with the two other *ai*. The highest concentrations of imidacloprid were achieved by injecting in the right position but the distribution was heterogeneous as for the central location. When injected on the right side, the bottom right sector was the most concentrated whatever the time, reaching an average concentration of $19.50 \pm 36.81 \mu\text{g/g}$ at 20 DAI. The top center and the top right sectors had also significant concentrations. As shown above, when injected in the central point, concentrations were lower but with a more homogeneous distribution between quadrants.

When injection points were left located in branches, the distribution seemed the most homogeneous but the concentrations were the lowest with a maximum average concentration at $1.92 \pm 2.87 \mu\text{g/g}$ in the top center at 7 DAI. At this date the bottom left is the second highest concentrated zone. At 20 DAI, the bottom center sector is the most concentrated with $1.07 \pm 2.88 \mu\text{g/g}$. All the other sectors had a concentration around $0.4 \mu\text{g/g}$ except the bottom right that was the lowest. At 41 DAI, concentrations in the bottom center and left and in the top center decreased while concentrations in the other zones increased. At 62 DAI, concentrations decreased in all the sectors. The top sectors were more concentrated than the lower part of the foliage.

To estimate the bioavailability, an apparent transfer coefficient TC_{app} was calculated from ratio of mean concentration in one BP to *ai* dosage. The apparent transfer coefficient was higher for right side injection of imidacloprid. The pyrimethanil bioavailability was from two to twenty times lower than imidacloprid bioavailability.

Concentration in apple fruit

At 41 DAI (October 4, 2017), apple fruits were ripe and fruits were harvested. No imidacloprid or difenoconazole residues were detectable in fruits. By contrast, pyrimethanil was quantified in one sample at a concentration of 0.018 mg/kg .

Pharmacokinetics analysis

As it is done in animal or human pharmacology to study the fate of drug, we performed a pharmacokinetic analysis of our data. Various parameters were estimated to characterize the evolution over time of imidacloprid concentrations in foliage. Because of the small number of sampling times, a non-compartmental analysis of the concentration values has been performed. First, the area under the curve (AUC) of concentrations versus times were calculated for each branch in each sector, from the injection time (0 DAI) to last sampling date (62 DAI) (Figure 5). The concentration fate of each sector can be counted as independent from the others but they are supplied by the same source of a.i. Therefore, the AUC_0^{62} total in each PB was the sum of AUC_0^{62} for each sampling sectors of the PB. As for concentrations, AUCs were highly variable from one sector to another, and summation did not compensate the distribution variability (Table 3).

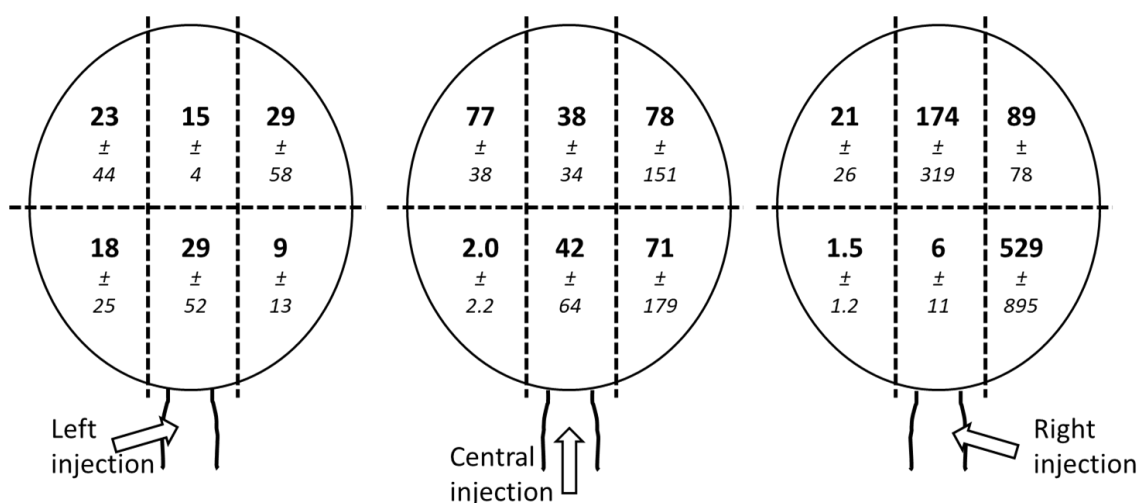


Figure 5: Area under the time-concentration curve from 0 to 62 DAI, AUC_0^{62} , in primary branch sectors after imidacloprid injection at different injection site locations, expressed in $\text{day} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \pm \text{sd}$, $n = 9$.

AUC_0^{62} was a partial result because it did not take in account the fate of ai after le last sampling. To calculate total AUC from time 0 to infinity, the elimination constant of imidacloprid, k_e , was estimated in various sectors when concentrations was sufficient (Table 3). Despite the high concentration variability between sectors, and the small number of points (3) used to calculate k_e , the variability was remarkably low ($\text{CV} = 24\%$). An average half-life of 12.2 ± 3.84 days was calculated from k_e for imidacloprid in apple

foliage. This allowed to calculate residual AUC from 62 DAI to ∞ , AUC_{62}^{∞} , and then the total primary branches AUC, AUC_0^{∞} (Table 3).

In same way that AUC, AUMC (area under moment curve) was calculated to determine mean residence time, MRT. Average MRT of imidacloprid in apple leaves was 24.86 ± 7.46 .

Table 3: Pharmacokinetic parameters from imidacloprid and pyrimethanil in apple leaves after trunk injection calculated by non-compartmental analyses. \pm Standard error. $n=9$.

Pharmacokinetic Parameters		Imidacloprid			Pyrimethanil	Difenoconazole
		Left*	Center*	Right*	Center	Center
T_{max}	d (day)	20			41	62
C	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0.4 ± 0.5	2.3 ± 2.2	5.0 ± 6.5	0.13 ± 0.22	0.001
C_{max}	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	2.3 ± 2.1	9.7 ± 10	23.2 ± 35.0	0.4 ± 0.6	< LOD
TC_{app}	$\%\cdot\text{g}^{-1}$	2.4 ± 2.5	11.5 ± 10.8	24.8 ± 32.9	1.3 ± 2.2	-
AUC_0^{62}	$\text{d}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	104 ± 76	262 ± 188	724 ± 915	25 ± 45	-
AUC_0^{∞}	$\text{d}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	113 ± 83	276 ± 193	792 ± 979	-	-
AUMC	$\text{d}^2\cdot\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	3243 ± 2638	5878 ± 3863	18931 ± 24174		
k_e	d^{-1}	0.06623 ± 0.0151	0.0585 ± 0.0046	0.0601 ± 0.0175	nd	-
$T_{1/2}$	d	10.93 ± 2.79	11.91 ± 0.99	12.74 ± 4.80	-	-
MRT	d	26.4 ± 9.96	24.1 ± 4.7	24.1 ± 7.5	-	-

C, average *ai* concentration in leaves of PB; C_{max} , maximum *ai* concentration in leaves; T_{max} , maximum *ai* concentration time; TC, transfer coefficient; k_e , terminal rate constant or elimination constant; AUC_0^{62} , AUC from 0 to time of last time sampling; AUC_0^{∞} , total AUC extrapolated to infinite; $T_{1/2}$, elimination half-life. MRT, maximum residence time. *, $n=4, 6$ and 14 , respectively for k_e determination of left, center or right injection. $n=9$ for other parameters.

DISCUSSION

In most sectors, the maximum concentration of imidacloprid was found at 20 DAI. That was in accordance to Aćimović et al. (2014) that found a maximum concentration of imidacloprid at 28 DAI in apple tree. Thus, despite the high water solubility (610 g/l at 20°C) and the low log K_{ow} (log K_{ow} = 0.57), imidacloprid was not rapidly transferred to the tree after injection. Several factors seemed to delay the transfer. Among these, the viscosity of the injected solution, which could increase the hydraulic resistance in the injected vessels. This would reduce the speed of the sap flow. Adsorption of the compounds into the vascular bundles or radial diffusion to xylem parenchyma could also slow down the transfer. The risk will be increased with more lipophilic molecules such as pyrimethanil and difenoconazole. The latter ones presented an even more delayed T_{max} , 41 and 62 DAI, respectively. Moreover, the translocation factor was about ten times lower for pyrimethanil than imidacloprid ones, and it could not be calculated for difenoconazole due to the low transfer of this molecule. This point accredited the fact that adsorption in the xylem is one of the important points to consider for the bioavailability and transfer efficiency of active ingredients after trunk injection.

This study showed a high variability of the distribution of *ai* in trees. The variability came from the heterogeneous distribution and not to a sampling bias. Indeed, if we consider the sectors where concentrations are relatively high, concentrations showed a kinetic evolution consistent with an absorption phase, reaching a maximum peak, followed by a consistent elimination phase as illustrated by the high regression coefficients of K_e .

Whereas this high variability, two parameters, the half-life $T_{1/2}$ and the MRT of imidacloprid, were relatively constant whatever the sector of the canopy. Imidacloprid's MRT was likely correctly estimated despite of short range of sampling time because the ratio of estimated total AUC_0^∞ to AUC_{62}^∞ was close to 1. That indicated a low elimination of imidacloprid after the last sampling. Both parameters were relatively low showing that imidacloprid remained in apple leaves for only one month and were indicative of the range of duration of efficacy. As imidacloprid was not excreted by plant, that was also indicative of the imidacloprid metabolism activity in apple tree.

The location of the injection site was the main factor affecting distribution efficiency. An injection on the right side of the PB resulted in a more efficient distribution of the molecule.

However, the variability was still high (CV: 130%). The anatomy of the apple trees in the trial orchard would partly explain this finding. On one hand, the water transport in this apple tree cultivar seemed to have a clockwise spiral pathway (Personal communication). On the other hand, the goblet pruning resulted of a secondary branch discarded in the inner face of PB. As a result, a part of the left injection would be blocked because it is no more associated with active xylem bundles. Pruning process also takes place on the outside faces of the carpenters. Combined with the sectorisation of the sap flow, this led to an increase in the variability observed in both the distribution and the concentrations. The impact of sectorised flow distribution on the *ai* distribution was reported by Tanis et al. (2012). The sectorization of sap flow distribution limited the lateral diffusion of molecules at all levels of the branches and thus participated in the high variability of the distribution.

Another point to consider is the volume of foliage in all the part of the canopy. In pharmacology, the dose is calculated according to the weight of the body. Here, this was not the case, the dose was fixed. Even if the allometric parameters of a species could be little variables, the pruning introduced likely strong variability. The number of injection points which is reasoned to cover the whole canopy according to the volume of the canopy will therefore also have to be reasoned according to the diameter of the tree in order to compensate for this variability.

In addition, the systemic xylem transfer of imidacloprid resulted in *ai* residue in fruit far below the LMRs, whatever the sector. Although water distribution in fruits during their development comes from the xylem, mainly in the early stages, they are mainly fed by the phloem Coslor et al. (2019) found also low level of compound in apple but they picked fruit before harvest time. He also evaluated residues in nectar and pollen in flowers but recorded low level.

The estimation of T_{\max} and C_{\max} provided little information on the actual bioavailability of the *ai* after injection or on the persistence of the treatment in the foliage. However, the AUC and the transfer coefficient gave an estimation of bioavailability of *ai*. The TC_{app} ratio was calculated at the steady state time. Therefore, it is not a true bioavailability coefficient F because it did not integrate the fraction of the molecule, which was immobilized into xylem tissues. However, the TC_{app} allowed estimating that imidacloprid was from 5 to 40 times more available to foliage than pyrimethanil, at equivalent dosage. If the bioavailability factor F could not be calculated, TC_{app} expression

could enable to compare the transfer of different preparations of the same active ingredient, or to compare the transfer efficiency of different PPPs independently of their dosage. Similarly, it would allow the transfer quality of a preparation to be compared in two different species.

A true F could be calculated from AUC ratio of extravascular AUC to a reference absolute AUC. In animal pharmacology, this absolute AUC is the intravenous AUC (AUC_{iv}) after drug bolus injection. It allows comparison of other routes of administration or drugs and galenic forms. No absolute AUC can be built because it cannot be possible to directly inject ai in foliage. Trunk injection is used to replace a spray treatment for which the effective dose and duration of effectiveness are known. Therefore, the AUC of such a treatment, AUC_{spr} , could be used as a reference AUC, although AUC_{iv} and AUC_{spr} are not comparable conceptually. These studies should be performed at the tree level and by sectors by integrating all injection sites into a single administration dose. In view of the variability, the quality of the sampling will also be an important factor to be taken into consideration.

In this article, we analyzed our results with a non-compartmental model because we had few measurement points. However, this analysis gives access to a limited number of parameters only, which are unreliable because of this small number of points. Increasing the number of sampling dates would increase the reliability of the results and also refine the kinetics of the active ingredients. On the other hand, this would allow to change the pharmacokinetic analysis model and compensate for the lack of information in the non-compartmental analysis.

The pharmacokinetic approach has recently been used for the first time for the analysis of the fate of organic contaminants in plants (Chen et al., 2017). However, this study was conducted on non-permanent herbaceous plants and for contaminants in the soil. For this purpose, the analysis was performed with a non-compartmental drip model. Although we also used a non-compartmental model with one input by bolus for the analysis of our data, we propose to increase the strength of the pharmacokinetic analysis of trunk injection by using a mono-compartmental model, similar to a *per os* (oral) administration in an animal model.

Conceptually, injection into the trunk can be considered as an administration of an oral bolus of drug: the foliage constituting the central compartment of the body, equivalent

to the blood compartment in animal models and the trunk the gastric compartment where the *ai* is placed.

Indeed, the *ai* transfer from the injection site to the foliage will rely on the speed of transport of the solution injected into the vascular system, the retention of *ai* in the vessels and possibly its degradation. These phenomena can be integrated into transfer constant, similar to the absorption constant K_a between the intestine and the plasma compartment, in an animal model. Similarly, the foliar compartment may be considered as a single reception compartment, comparable to the blood compartment. In the tree, there would be no other compartments and the clearance, Cl , of the system would essentially be a metabolic clearance. One of the interests to mono-compartmental model was to be able to have access at the absorption constant K_a and to determine the bioavailability F of *ai*.

In studies of treatment by aerial spraying, the effective dose can be calculated quite empirically from a dose-response curve. In addition, in practice, a treatment can be done at the time of the parasite appearance; the application of the treatments coincides with the presence of the parasite. In the case of injection, an additional degree of anticipation of treatment should be considered because of the transfer time between the injection site and the foliar target.

On the other hand, in diseases such as apple scab, it is necessary to treat even when the disease is not declared. There is a need for long-term coverage. Knowledge of the evolution of the distribution in the plant and consequently of reliable kinetic parameters such as the absorption constant or the bioavailability of the molecule is therefore essential to correctly position the dosage and the number of repetitions over time. Knowledge of the bioavailability, or absorption constants, k_a , and elimination K_e or the clearance, Cl , of *ai* would allow better analyzing the fate of an injection in the trunk, to be able to compare molecules or their preparations, or different injection modes. This modeling would also enable better planning repeated injections to maintain an effective concentration over a longer period.

CONCLUSION

On one hand, we showed that injection into the trunk does not allow a homogeneous distribution of the active substance in the foliage but the increase in the number of injection

points should compensate this heterogeneity, as well as ensuring a total coverage of the tree.

On the other hand, we propose that the analysis of foliar concentration data should be carried out according to a mono-compartmental PK model. This would allow comparing injection methods, *ai* or preparations with classical spray treatment methods.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by grants from the French “Competitiveness Cluster Program – Single Interdepartmental Fund”, BPI France Funding. The authors would like to thank the Avale family, arborists, for lending us the apple trees (Corbarieu, France). The authors thank CETEV (Le Faget, France), particularly Dr Adeline Renier, for trunk injection management and CTIFL (Prignonrieux, France)

REFERENCES

- Aćimović, S.G., Vanwoerkom, A.H., Reeb, P.D., Vandervoort, C., Garavaglia, T., Cregg, B.M., Wise, J.C., 2014. Spatial and temporal distribution of trunk-injected imidacloprid in apple tree canopies. *Pest Manag. Sci.* 70, 1751–1760. <https://doi.org/10.1002/ps.3747>
- Aćimović, S.G., Zeng, Q., McGhee, G.C., Sundin, G.W., Wise, J.C., 2015. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Front. Plant Sci.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00016>
- Berger, C., Laurent, F., 2019. Trunk injection of plant protection products to protect trees from pests and diseases. *Crop Prot.* 124. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.05.025>
- Briggs, G.G., Bromilow, R.H., Evans, A.A., 1982. Relationships Between Lipophilicity and Root Uptake and Translocation of Non-ionised Chemicals by Barley " 495–504.
- Byrne, F.J., Krieger, R.I., Doccola, J., Morse, J.G., 2014. Seasonal timing of neonicotinoid and organophosphate trunk injections to optimize the management of avocado thrips in California avocado groves. *Crop Prot.* 57, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.11.023>
- Byrne, F.J., Urena, A.A., Robinson, L.J., Krieger, R.I., Doccola, J., Morse, J.G., 2012. Evaluation of neonicotinoid, organophosphate and avermectin trunk injections for the management of avocado thrips in California avocado groves. *Pest Manag. Sci.* 68, 811–817. <https://doi.org/10.1002/ps.2337>
- Chen, H.-R., Rairat, T., Loh, S., Wu, Y., Vickroy, T.W., Chou, Chi, C., 2017. Assessment of

- veterinary drugs in plants using pharmacokinetic approaches : The absorption , distribution and elimination of tetracycline and sulfamethoxazole in ephemeral vegetables. *PLoS One* 12, 1–16.
- Coslor, C.C., Vandervoort, C., Wise, J.C., 2019. Insecticide dose and seasonal timing of trunk injection in apples influence efficacy and residues in nectar and plant parts. *Pest Manag. Sci.* 75, 1453–1463. <https://doi.org/10.1002/ps.5268>
- Doccola, J.J., Bristol, E.J., Sifleet, S.D., Lojko, J., Wild, P.M., 2007. Efficacy and duration of trunk-injected imidacloprid in the management of Hemlock woolly adelgid (*Adelges tsugae*). *Arboric. Urban For.* 33, 12–21.
- Doccola, J.J., Smitley, D.R., Davis, T.W., Aiken, J.J., Wild, P.M., 2011. Tree wound responses following systemic insecticide trunk injection treatments in green ash (*Fraxinus Pennsylvanica* Marsh.) as determined by destructive autopsy. *Arboric. Urban For.* 37, 6–12.
- Fettig, C.J., Grosman, D.M., Munson, A.S., 2013. Advances in Insecticide Tools and Tactics for Protecting Conifers from Bark Beetle Attack in the Western United States, in: *InTech* (Ed.), *Insecticides-Development of Safer and More Effective Technologies*. Rijeka, Croatia, pp. 472–492. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Flower, C.E., Dalton, J.E., Knight, K.S., Brikha, M., Gonzalez-Meler, M.A., 2015. To treat or not to treat: Diminishing effectiveness of emamectin benzoate tree injections in ash trees heavily infested by emerald ash borer. *Urban For. Urban Green.* 14, 790–795. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2015.07.003>
- Hu, J., Wang, N., 2016. Evaluation of the Spatiotemporal Dynamics of Oxytetracycline and Its Control Effect Against Citrus Huanglongbing via Trunk Injection. *Dis. Control Pest Manag.* 106, 1495–1503.
- Orians, C.M., Vuuren, M.M.I. Van, Harris, N.L., Babst, B.A., Ellmore, G.S., 2004. Differential sectoriality in long-distance transport in temperate tree species : evidence from dye flow , 15 N transport , and vessel element pitting 501–509. <https://doi.org/10.1007/s00468-004-0326-y>
- Percival, G.C., Boyle, S., 2005. Evaluation of microcapsule trunk injections for the control of apple scab and powdery mildew. *Ann. Appl. Biol.* 147, 119–127. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.00019.x>
- Pertot, I., Caffi, T., Rossi, V., Mugnai, L., Hoffmann, C., Grando, M.S., Gary, C., Lafond, D., Duso, C., Thiery, D., Mazzoni, V., Anfora, G., 2017. A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. *Crop Prot.* 97, 70–84. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.025>
- Sanchez-Zamora, M.A., Fernandez-Escobar, R., 2000. Injector-size and the time of application affects uptake of tree trunk-injected solutions. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 84, 163–177.
- Tanis, S.R., Cregg, B.M., Mota-sanchez, D., Mccullough, D.G., Poland, T.M., 2012. Spatial and

temporal distribution in Fraxinus trees. Pest Manag. Sci. 68, 529–536.
<https://doi.org/10.1002/ps.2281>

Vandervoort C, V.A., 2014. Trunk Injection: A Discriminating Delivering System for Horticulture Crop IPM. Entomol. Ornithol. Herpetol. Curr. Res. 03. <https://doi.org/10.4172/2161-0983.1000126>

Vanwoerkom, A.H., 2014. Trunk injection : An alternative technique for pesticide delivery in apples 65. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.017>

Wise, J.C., VanWoerkom, A.H., Aćimović, S.G., Sundin, G.W., Cregg, B.M., Vandervoort, C., 2014. Trunk Injection: A Discriminating Delivering System for Horticulture Crop IPM. Entomol. Ornithol. Herpetol. Curr. Res. 03, 3–9. <https://doi.org/10.4172/2161-0983.1000126>

3. Essai complémentaire : délai de transfert du difénoconazole

3.1 Introduction

Dans l'étude cinétique précédente, nous avons montré que le difénoconazole était peu ou pas transféré. La substance active est donc retenue au niveau du tronc et n'a pas atteint les feuilles au cours des 2 mois de l'essai. Nous avons donc émis l'hypothèse que la vitesse de translocation de cette molécule était très lente en comparaison des deux autres substances actives. Etant donné que des études avec d'autres molécules avaient montré une efficacité sur plusieurs années, nous avons aussi voulu examiner l'hypothèse d'un délai de translocation élevé de cette molécule et donc la possibilité pour le difénoconazole bloqué/stocké dans le bois d'être remis en circulation l'année d'après (Grosman *et al.*, 2010; Doccola *et al.*, 2012). Dans ce but, le transfert du difénoconazole a été suivi sur des temps plus longs, au cours de l'année d'injection et l'année suivante.

Matériel et méthode

3.2 Matériel végétal

Les injections ont été réalisées sur des pommiers de la variété Mariri Red Aporo® sur une parcelle du CTIFL (Prignonrieux, 24). Les pommiers, âgés de 15 ans, étaient conduits en palissade. Pour cet essai, 12 arbres ont été sélectionnés et répartis en 4 blocs de 3 arbres.

3.2.1 Substances actives et injections

Le difénoconazole injecté était du difénoconazole reformulé par le partenaire du projet Belchim Crop Protection à 7,5 mg/mL.

Une ou 6 injections ont été pratiquées au cours de la saison. Dans les deux cas, la première injection a été réalisée le 23/03/2016. Les injections ont été effectuées avec l'appareil Wedgle® Direct-Inject System (ArborSystems LLC, NE, USA) à environ 50 cm du sol, avec une aiguille de 19 mm de long pour 2 mm de diamètre. 1 mL de solution était délivré par point d'injection avec une pression manuelle. Deux points d'injection par arbre ont été effectués à chaque application.

3.2.2 Echantillonnage

Dans les deux cas, les feuilles ont été collectées au même moment, en juillet 2016, en août 2016 puis l'année suivante en juin 2017. Deux zones de prélèvements distinctes ont été définies, à savoir au-dessus et en-dessous de 2 m du sol. 20 feuilles ont été prélevées par zone et les feuilles des trois arbres d'un bloc ont été regroupées en un seul échantillon.

3.2.3 Analyses des échantillons

Les feuilles ont été analysées en LC-MS/MS par le laboratoire Phytocontrol (Nîmes). La limite de quantification du difénoconazole était de 0,01 mg/kg.

3.3 Résultats et discussion

Comme dans l'étude précédente, les concentrations retrouvées dans les feuilles sont très variables et très faibles au regard de la dose injectée dans les arbres, même à des temps longs après l'injection (Figure 20a). Cela tendrait à montrer que le transfert du difénoconazole est très faible et que précédemment les faibles concentrations retrouvées (voir article ci-dessus) ne proviennent pas d'une mauvaise échéance de prélèvement. Dans cet essai, les doses injectées étaient deux fois plus faibles. Toutefois, la quantité totale injectée par arbre est presque la même dans les deux essais (2 fois 7,5 mg/ml ou 16 mg/ml). Afin de pallier le faible transfert, des essais de multi-injections ont été réalisés en pratiquant 6 injections durant la saison, à raison d'une injection environ toutes les 3 semaines. La Figure 20b montre les concentrations dans les feuilles récoltées durant les semaines suivant la dernière injection. Dans ce cas-là, les concentrations retrouvées dans les feuilles sont supérieures à la LOQ dans presque tous les prélèvements. Cela montre qu'une répétition de l'injection permet d'augmenter la concentration dans le feuillage et que la totalité du difénoconazole ne reste pas retenu dans le tronc. Seconde observation, après une répétition des injections, les concentrations dans les feuilles échantillonnées en bas sont systématiquement supérieures à celles de feuilles prélevées en partie haute de l'arbre. Cela montre sur ce type de conduite de verger, arbre mono-axe de haute taille que, soit les branches du bas interceptent le flux de substances actives, soit la concentration dans les feuilles est inversement proportionnelle à la distance parcourue du point d'injection à la feuille-puit. Enfin, des dosages pratiqués l'année suivante sur les mêmes arbres, donc sur un nouveau feuillage, montrent très peu de relargage du difénoconazole

piégé dans le tronc après injection, les concentrations étant autour de la LOQ de la molécule.

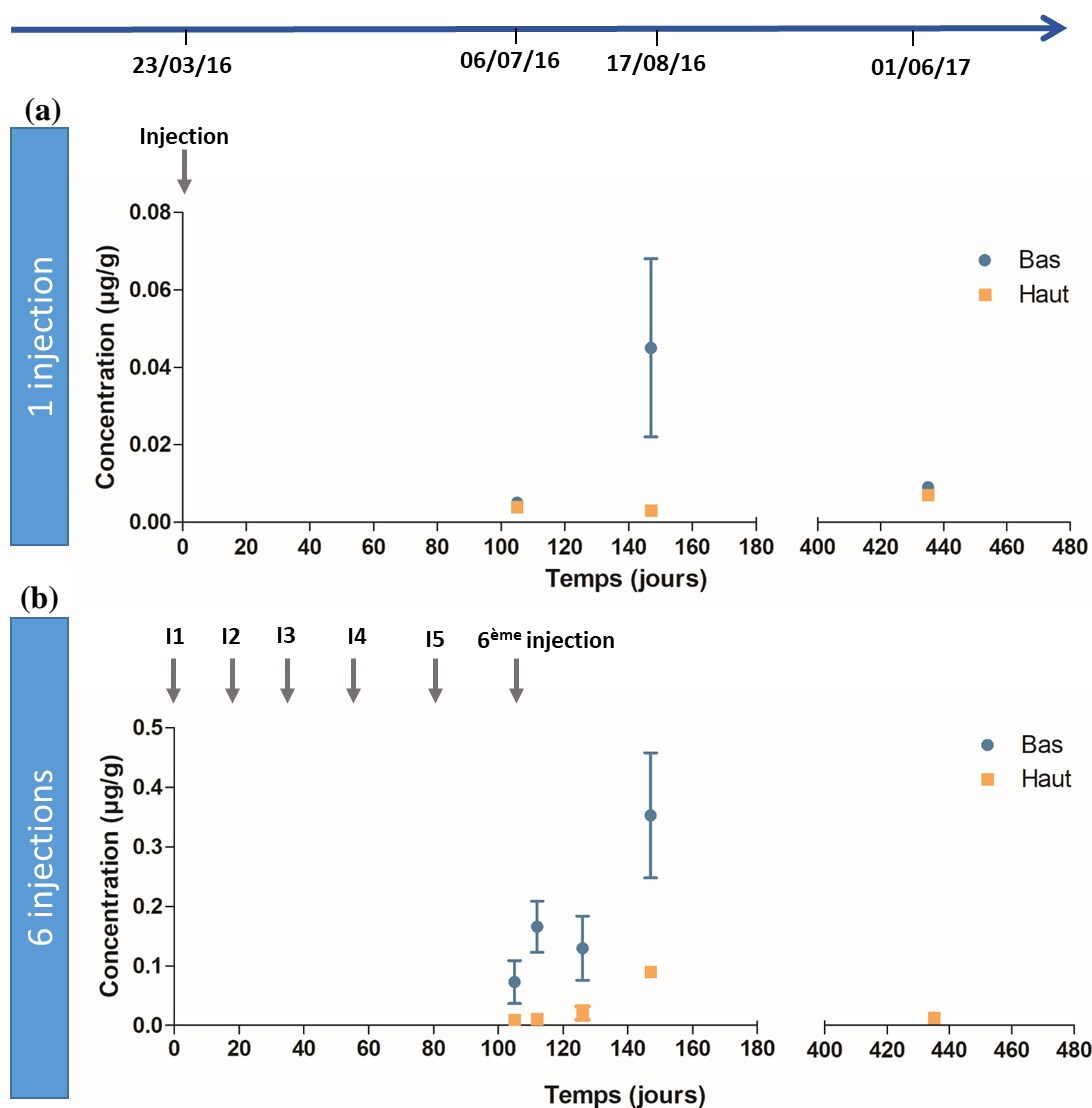


Figure 20 : Evolution des concentrations de difénoconazole dans les secteurs haut et bas du feuillage en fonction du temps (a) après 1 injection, (b) après 6 injections. LOQ=0,01.

4. Conclusions du chapitre

Ces essais ont montré une grande variabilité intra- et inter-arbres dans la distribution des substances actives injectées dans le tronc. Cette hétérogénéité devrait pouvoir être compensée par la multiplicité des points d'injection en fonction de la circonférence de l'arbre à traiter ou de l'essence considérée. Nous avons aussi montré que la répétition des

injections au cours de la saison permettait d'augmenter les concentrations retrouvées dans le feuillage, l'intervalle de temps entre deux injections devant dépendre de la molécule. De plus, nous avons montré que la lipophilie des molécules était un paramètre important de leur transfert, des molécules de faibles $\log K_{ow}$ sont à prioriser. Néanmoins, pour des molécules lipophiles, comme le difénoconazole, leur transfert est très faible et de plus ne semble pas perdurer dans le temps au-delà de l'année de traitement.

D'autre part, au moment de la récolte, les résidus dans les fruits étaient au-dessous des LMR. Cela permet de montrer que le risque sanitaire chimique de cette méthode semble faible et ne doit pas être considéré avec plus de rigueur (ni moins, toutefois) qu'un traitement chimique conventionnel.

Nous avons réalisé une analyse pharmacocinétique de nos données avec un modèle non-compartimental. Celle-ci n'a pu être approfondie à cause d'un trop faible nombre d'échéance de prélèvement, notamment au regard de la lenteur cinétique de certaines molécules. Toutefois, cette analyse nous a fourni des informations intéressantes pour apprécier la qualité de l'injection et le devenir des substances actives dans l'arbre. L'analyse phyto-pharmacocinétique de la distribution des substances actives après l'injection permet donc un suivi paramétré des molécules injectées avec plus de pertinence que la simple observation des concentrations dans le feuillage. L'analyse phyto-pharmacocinétique n'est actuellement que très peu pratiquée puisqu'à notre connaissance ce n'est que la seconde fois qu'elle est utilisée. De plus, la première étude de ce genre a été réalisée avec un modèle non-compartimental de perfusion, sur une problématique totalement différente de la nôtre, sur des plantes herbacées dans un contexte de pollution des sols.

Nous avons aussi proposé qu'à l'avenir, l'analyse des données de concentrations foliaires après injection dans le tronc soit réalisée avec un modèle plus sophistiqué afin d'accroître la puissance de l'analyse pharmacocinétique. Par analogie avec les modèles de pharmacocinétique humaine et animale après absorption orale, un modèle mono-compartimental devra être utilisé (Figure 21).

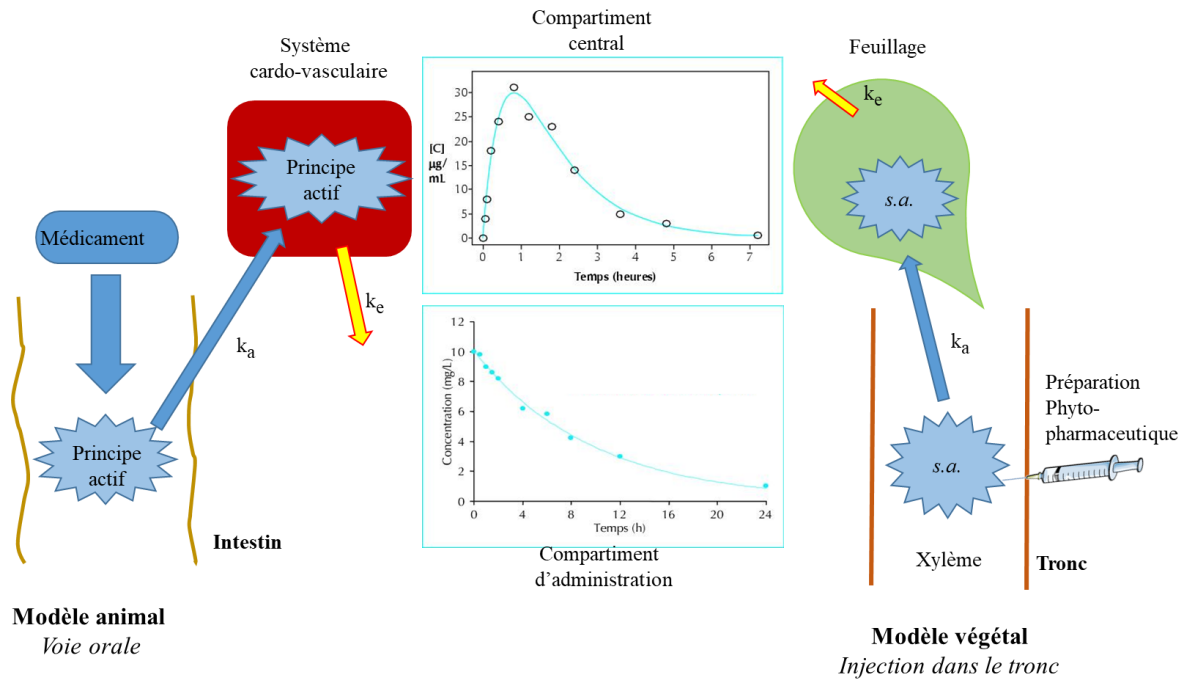


Figure 21 : Analogie entre le modèle pharmacocinétique mono-compartmental après administration orale d'un médicament chez l'animal ou l'homme et un modèle phytopharmaceutique mono-compartmental après injection dans le tronc d'un arbre d'une préparation phytopharmaceutique.

Ce modèle permettra d'estimer, la constante d'absorption des substances actives, leur biodisponibilité réelle, et des paramètres liés à la durée pendant laquelle elles pourront être présentes dans les feuilles à des concentrations supérieures à leur seuil d'efficacité (Figure 22). Cela permettrait de comparer des méthodes d'injection, des substances actives ou leurs préparations, mais aussi de comparer cette technique avec les méthodes conventionnelles de traitement par pulvérisation.

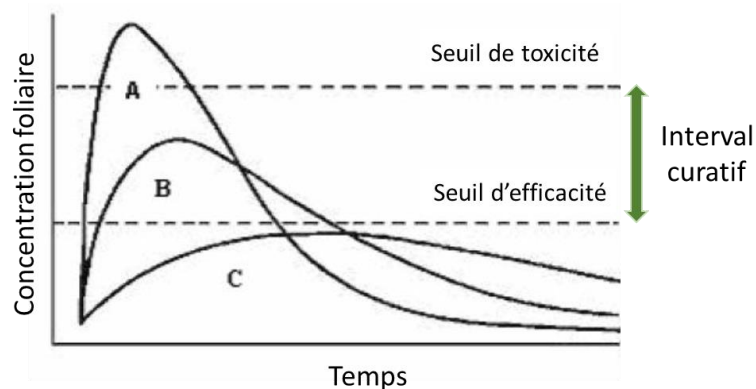


Figure 22 : Représentation schématique de la pharmacocinétique foliaire après injection dans le tronc, soit d'une substance active injectée sous forme de trois préparations différentes, A, B et C ; ou de trois substances actives différentes, A, B et C.

CHAPITRE 4 : TROUVER LES PARAMETRES QUI CONTROLENT LA REPARTITION DES SUBSTANCES ACTIVES VERS LE FEUILLAGE

1. Introduction

Comme exposé précédemment, l'injection au travers de l'écorce permet de positionner les substances actives au niveau de l'aubier, dans le tissu xylémien. Une fois la substance active délivrée, il est indispensable qu'elle soit emportée par le flux xylémien de sève brute vers les parties aériennes pour atteindre la cible foliaire visée. Cette étape est soumise à différents facteurs liés à l'anatomie du système vasculaire de l'arbre, à sa physiologie ainsi qu'aux caractéristiques physico-chimiques des molécules injectées.

En ce qui concerne l'anatomie de l'arbre, les principaux facteurs pouvant avoir un impact sur le transfert sont le type de xylème et la sectorisation, ou à l'inverse l'intégration, du système vasculaire. Comme décrit dans le chapitre I, il existe trois types de xylème : non poreux, poreux diffus ou poreux (Chaney, 1986). Selon le type, le nombre de cerne actifs dans la conduction de la sève brute n'est pas le même. Les arbres de type poreux utilisent principalement le dernier cerne alors que les arbres non poreux et poreux diffus utilisent plusieurs cernes, jusqu'à une dizaine chez le pin (Kozlowski, Hughes and Leyton, 1967; Chaney, 1986). Le degré de sectorisation est aussi lié au type de vaisseaux xylémiens. Selon Orians et al. (2005) et Zanne et al. (2006), les arbres avec un degré de sectorisation important sont ceux qui ont des vaisseaux de grande taille et en faible densité. Cela signifie que les arbres de type non-poreux ou poreux-diffus auraient une meilleure intégration de leur système vasculaire que les arbres poreux. Le type de vaisseaux, leur taille, leur densité ainsi que le nombre de ponctuations et leur taille vont donc avoir un impact sur le transfert et la répartition des substances actives dans le système vasculaire (Zanne, Sharma and Orians, 2006; Aćimović *et al.*, 2014). La composition chimique du xylème est aussi importante puisque les molécules peuvent avoir une affinité plus ou moins forte avec la lignine présente sur les parois des vaisseaux (Mackay and Gschwend, 2000).

En ce qui concerne les molécules, les facteurs qui devraient le plus influencer leur transfert sont leur solubilité dans l'eau - pour permettre leur dissolution dans la sève - et leur lipophilie. En effet, les molécules lipophiles vont avoir tendance à s'adsorber sur la lignine, une macromolécule fortement lipophile, perturbant de ce fait leur transfert (Mackay and Gschwend, 2000). La concentration qu'il sera possible d'injecter sera aussi déterminée par la solubilité de la molécule dans l'eau. Pour les molécules ionisables, leur pKa influencera leur transfert car cela conditionne leur diffusion à travers les membranes et donc leur maintien dans le courant de transpiration ou leur sortie des vaisseaux

xylémiens (Sur and Stork, 2003). L'utilisation de co-formulants dans les préparations phytosanitaires spécifiques pour la micro-injection, en modifiant les caractéristiques des solutions injectées, devraient moduler leur transfert (Dal Maso, Cocking and Montecchio, 2017). Ces facteurs ont été décrits plus en détail dans le chapitre d'introduction.

Pour déterminer les paramètres qui expliqueraient la distribution des substances actives telle qu'elle a été observée dans le chapitre précédent, et pour optimiser le transfert des molécules, il est nécessaire de comprendre quel impact ont ces différents facteurs. De plus, afin d'ajuster la concentration à injecter pour qu'elle soit efficace une fois dans la canopée, il faut aussi connaître le taux de transfert des molécules vers les feuilles.

Le premier objectif de ce chapitre était donc de connaître la répartition de l'injectât dans différentes essences juste après l'injection afin d'identifier l'impact de l'anatomie de leur système vasculaire. Pour cela, la répartition au point d'injection de colorants, éosine et bleu de bromophénol, et leur transfert dans le tronc ont été étudiés.

Le deuxième objectif était de quantifier l'impact des caractéristiques physico-chimiques, principalement la lipophilie, des molécules sur leur transfert et de trouver des voies d'amélioration de la formulation. Dans un premier temps, l'impact de la lipophilie sur le transfert a été étudié *ex-vivo* sur des branches excisées, les paramètres d'adsorption étant ensuite déterminés sur du bois broyé. Dans un second temps et de la même manière, l'impact de co-formulants, et plus précisément de tensio-actifs a été exploré. Enfin, l'influence de la viscosité des préparations sur le flux de sève a été évalué *ex vivo*.

2. Répartition de l'injectât

Lors de l'injection, la solution de substances actives est injectée par pression manuelle dans le tissu xylémien. Sous l'effet de la pression, la solution de traitement est poussée dans l'aubier constitué des vaisseaux xylémiens, de fibres et de tissu parenchymateux. La structure l'aubier est très variable selon les essences d'arbres. L'objet de cette étude est donc de connaître la répartition de l'injectât au niveau de la zone d'injection dans les premières heures suivant l'injection. Trois espèces d'arbres ont été choisies pour représenter les trois types de xylème, le pin (bois non-poreux), le pommier (bois poreux diffus) et le châtaignier (bois poreux). Les injections ont été réalisées avec des solutions de colorants hydrosolubles permettant de les localiser à l'œil nu.

2.1 Matériels et méthodes

2.1.1 Matériel végétal

Les arbres étaient des pommiers de la variété Royal-Gala, des pins noirs d'Autriche et des châtaigniers de la variété Courte pointue. Les arbres, âgés de 3 ans pour les pommiers et les châtaigniers et de 6 ans pour les pins, étaient cultivés en conteneurs dans un mélange de terreau horticole et arrosés *ad libitum*. Le diamètre des troncs au niveau du point d'injection, c'est-à-dire à environ 30 cm du sol, était de 4 cm pour les pommiers (12,6 cm de circonférence), 7 cm pour les pins (circonférence : 22 cm) et 4,5 cm pour les châtaigniers (14 cm de circonférence).

2.1.2 Injections

1 ml de solution d'éosine A (1%) ou de bleu de bromophénol (1%) a été injecté à 30 cm du sol avec le système Wegle Direct Inject[®], système utilisé lors de l'essai en verger de pommiers (chapitre 3). Les aiguilles utilisées pour l'injection d'un diamètre de 2 mm mesuraient 19 mm de longueur pour les pins et 13 mm pour les deux autres essences. Chez les châtaigniers et les pommiers, une injection de chaque colorant a été réalisée, en opposition. Chez les pins, deux injections par colorant, positionnées en alternance, ont été effectuées. Les injections ont été réalisées le matin par temps pluvieux.

2.1.3 Observations

Les arbres ont été coupés 4 h après l'injection. Chez le pommier et le châtaignier, une coupe transversale a été réalisée au niveau du point d'injection puis tous les 20 cm au-delà du point d'injection. Pour le pin, les coupes ont été réalisées tous les 10 cm. Dans les trois cas, les coupes ont été réalisées jusqu'à ne plus pouvoir distinguer le colorant. Les troncs ont ensuite été écorcés pour suivre la trajectoire longitudinale des colorants en surface du bois.

2.2 Résultats

Dans l'ensemble, les colorants sont restés très localisés et peu de diffusion latérale a été observée chez les trois essences d'arbre.

2.2.1 Pommier

Sur pommier, les deux colorants sont bien visibles par observation en lumière naturelle. Au point d'injection, ils sont restés localisés avec peu de diffusion latérale. La zone colorée est d'environ 4 mm de large (Figure 23a). En profondeur, l'injectât s'étend sur trois cernes jusqu'à 12 mm de profondeur dans l'aubier. Cette profondeur correspond à la longueur de l'aiguille pénétrant dans ce dernier et la largeur de la zone d'injection représente environ deux fois la largeur de l'aiguille. Ensuite, plus les coupes sont hautes, plus la zone colorée est déformée par rapport à l'image initiale au point d'injection et moins la coloration est dense. 60 cm au-dessus du point d'injection, seuls les deux cernes les plus extérieurs présentent encore une densité de coloration nettement visible. L'injectât s'est décalé par rapport à l'orientation du point d'injection. Il a réalisé presque un demi-tour (Figure 23a), le cerne le plus extérieur ayant subi la rotation la plus importante. Ce transfert est spiralé dans le sens des aiguilles d'une montre. Après 4 h, les colorants sont visibles jusqu'à 1 m au-dessus des points d'injection. Sous l'effet de la pression d'injection, les colorants ont été distribués vers le haut, mais aussi vers le bas, puisque les colorants sont observés sur une distance d'environ 30 cm, en dessous du point d'injection. Cette distribution spiralée peut être plus facilement observée après écorçage du tronc, le trajet du colorant est alors bien visible en surface de l'aubier (Figure 23b).



Figure 23 : Photographies de la distribution d'une solution d'éosine ou d'une solution de bleu de bromophénol après leur injection dans un tronc de pommier montrant la sectorisation et la rotation de la distribution. (a) Section transversale du tronc : au point d'injection (0 cm) et tout les 20 cm. Les images sont orientées selon le même axe ; (b) Observation de la surface de deux tronçons consécutifs de tronc après écorçage montrant le parcours longitudinal de l'injection de bleu de bromophénol. Echelle = 5 mm.

Sur un des pommiers, une injection d'éosine a aussi été réalisée sous l'intersection entre une branche et l'axe principal (Figure 24). La coloration, toujours sectorisée sur une faible largeur (> 4 mm), peut être suivie, comme précédemment, à la surface du bois et montre que tout le colorant est distribué dans la branche qui se trouvait le plus dans l'axe

de l'injection. En revanche, une fois dans la branche, l'éosine a plus diffusé latéralement sur une largeur d'environ 1 cm dans les deux cernes extérieurs.



Figure 24 : Observation de la distribution de l'éosine après l'intersection d'une branche après injection dans un tronc de pommier. (a) Vue par-dessous de l'axe principal du tronc ; (b) Vue d'une section de la branche immédiatement après l'intersection. Echelle = 5 mm.

Une observation de la coupe d'un point d'injection a été réalisée au stéréo-microscope à zoom, selon la même méthode que celle utilisée dans le chapitre 2 (Figure 25). Elle a permis, grâce à la fluorescence de l'éosine, de localiser la répartition de l'injectât au regard de la zone impactée par la blessure d'injection. Cette image permet de voir que l'injectât reste principalement localisé dans la zone de colorée par la production de composés phénoliques en réaction à la blessure d'injection.

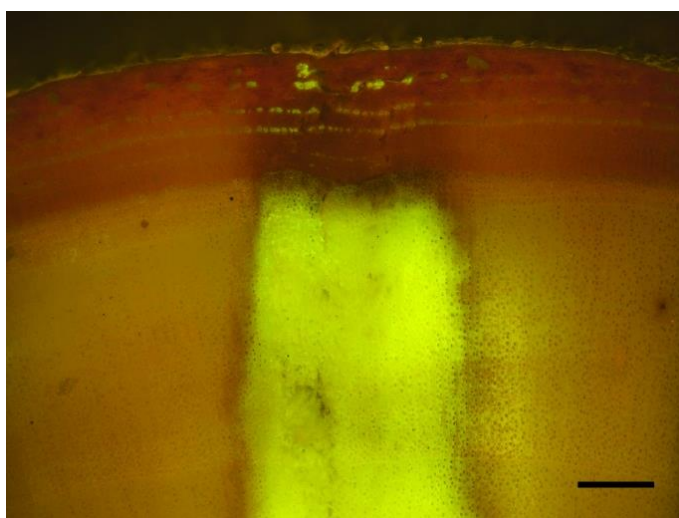


Figure 25 : Observation macroscopique en fluorescence d'une coupe transversale au niveau d'un point d'injection d'une solution d'éosine d'éosine. Echelle = 1 mm.

2.2.2 Châtaignier

Chez le châtaignier, au point d'injection, la zone de coloration dans l'aubier est plus floue que chez le pommier, c'est à dire avec une délimitation moins nette (Figure 26a). Les colorants se répartissent sur les 3 à 4 cernes atteints par l'aiguille de 13 mm. Les zones colorées sont plus larges dans le dernier cerne, de 5 à 6 mm de large, donc deux à trois fois la largeur de l'aiguille. Au point d'injection de l'éosine, le colorant s'est infiltré entre l'écorce et l'aubier, significatif d'un décollement de l'écorce au moment de l'injection (Figure 26b). 20 cm au-dessus du point d'injection, seuls les deux cernes extérieurs montrent la présence de colorants avec une zone de diffusion qui s'est élargie latéralement. Le transfert suit, ici, un mouvement rectiligne droit. L'éosine a ainsi été retrouvée jusqu'à 2 m de hauteur dans les branches présentes dans l'alignement du point d'injection. Cependant, une certaine rotation antihoraire semble présente pour l'injection de bleu de bromophénol. Lors de l'injection le produit s'est réparti vers le haut et vers le bas, mais dans ce cas la distance parcourue sous l'effet de la pression d'injection n'a pas pu être déterminée. Le dernier point de coupe sous le point d'injection, au niveau du collet, présentait encore des traces de colorants.

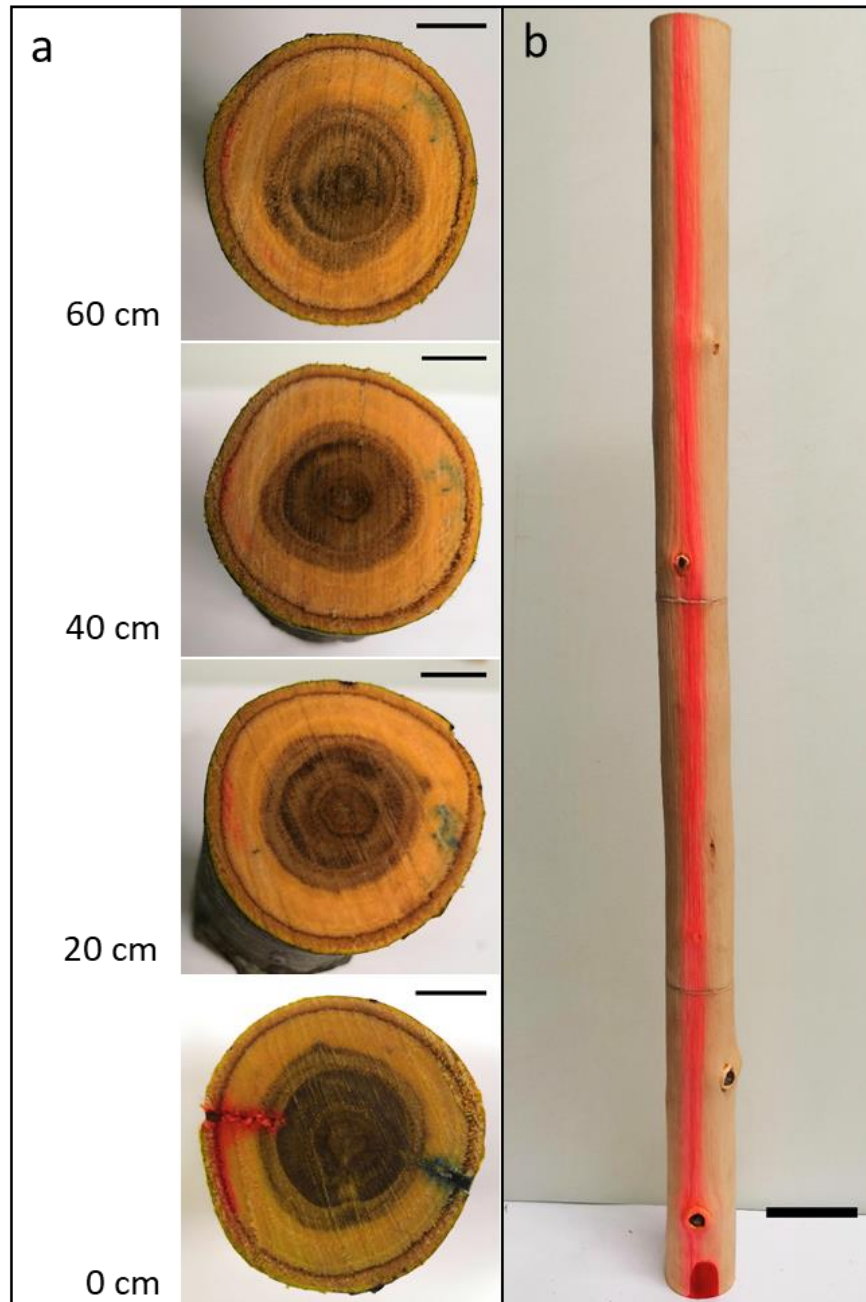


Figure 26 : Photographies de la distribution d'une solution d'éosine ou d'une solution de bleu de bromophénol après leur injection dans un tronc de Châtaignier. (a) Section transversale du tronc : au point d'injection (0 cm) et tout les 20 cm. Les images ont toutes la même orientation ; (b) Observation de la surface de trois tronçons consécutifs de tronc après écorçage montrant le parcours longitudinal de l'injection d'éosine à partir du point d'injection. Echelle : a = 1 cm ; b = 5 cm.

2.2.3 Pin

Chez le pin, au point d'injection, comme nous l'avions observé avec un autre type d'aiguille, il n'y a que très peu de diffusion latérale (Figure 27a). La largeur de diffusion

varie entre 2,5 et 4 mm pour une aiguille de 2 mm de diamètre. Dans l'axe de l'aiguille, les colorants atteignent une profondeur de 20 à 33 mm, alors que la longueur de l'aiguille n'est que de 19 mm. Il semble que pour trois des quatre injections examinées dans cet essai, le bois se soit fendu dans l'axe de l'aiguille au-delà de la pointe de l'aiguille. Cela expliquerait probablement des profondeurs de coloration de 33 mm, supérieures à la longueur de l'aiguille. Pour l'injection où le bois ne se serait pas fendu, la zone colorée présente la même longueur que l'aiguille. Toutefois, ce fendillement n'avait pas été retrouvé dans les essais préliminaires alors que la profondeur de diffusion de l'injectât, comme ici, était supérieure à la longueur de l'aiguille. Il y a donc de la diffusion radiale lors de l'injection et au point d'injection la coloration est intense. La première coupe au-dessus des points d'injection a été réalisée à 10 cm, où se trouvait une intersection de 4 branches (Figure 27b). A ce niveau, le bleu de bromophénol, qui est le colorant le plus visible chez le pin, est présent plutôt dans les cernes profonds, à partir du 3^{ème} cerne (depuis l'extérieur). De plus, les zones colorées sont complètement déformées et se répartissent sur presque la totalité de la circonférence du cerne. Une fraction de bleu de bromophénol a été captée par la plus grosse des quatre branches, la branche A, et s'est répartie sur l'intégralité du 2^{ème} cerne de celle-ci. (Figure 27d). 20 cm plus haut, seul le bleu de bromophénol est encore visible (Figure 27c), mais cette coloration n'apparaît plus dans des coupes supérieures. L'écorçage permet de mettre en évidence une trajectoire spiralée dans le sens des aiguilles d'une montre. Contrairement aux deux autres essences, pommier et châtaignier, aucune coloration n'est détectée sous le point d'injection.

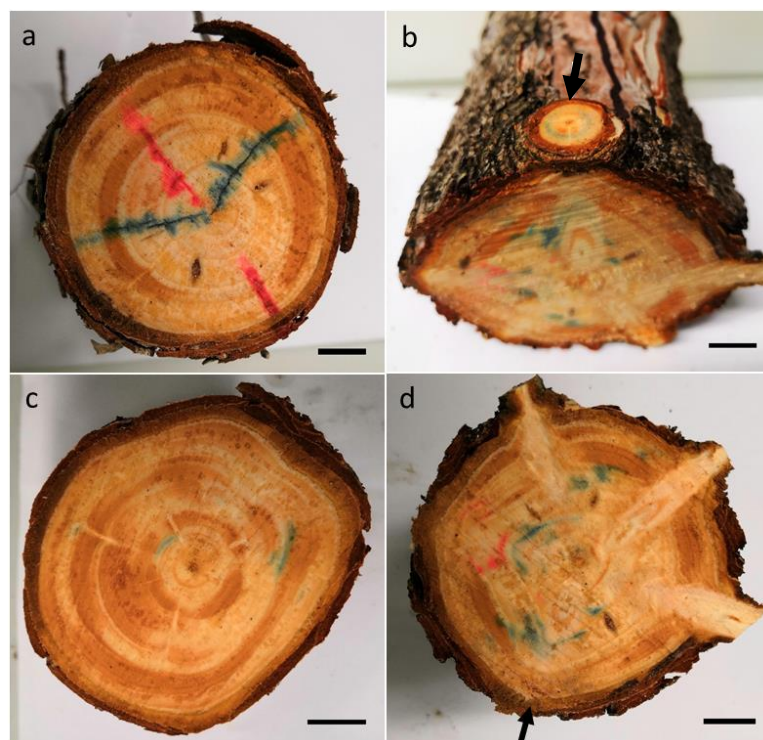


Figure 27 : Photographies de la distribution d’une solution d’éosine ou d’une solution de bleu de bromophénol après leur injection dans un tronc de pin. (a) Section transversale du tronc au point d’injection (0 cm) ; (b) Section transversale 10 cm au-dessus des points d’injection, à l’intersection de quatre branches. Vue par-dessus. La flèche indique l’axe de la branche observée en (d) ; (c) Section transversale 10 cm au-dessus de l’intersection ; (d) Même section transversale qu’en (b) mais vue par-dessous et montrant la section d’une des branches partant de l’intersection. Echelle = 1 cm.

2.3 Discussion

Cette expérimentation permet de faire un état des lieux de la répartition des colorants au point d’injection et de leur transfert 4 h après injection chez ces trois essences d’arbres.

Au point d’injection, peu de diffusion a été observée avec des zones colorées qui, dans l’ensemble, étaient restreintes aux dimensions de l’aiguille. Chez le pommier et le châtaignier, il y avait toutefois une répartition vers le haut et vers le bas sous l’effet de la pression d’injection, qui n’a pas été observée chez le pin. Au niveau de la zone d’injection, les colorations étaient beaucoup plus marquées chez le pommier et le pin que chez le châtaignier. Cela est certainement dû à un transfert plus rapide et une dilution de ces colorants due aux plus grands volumes d’eau circulant chez le châtaignier pendant les 4 h d’expérimentation. Les espèces poreuses ont en effet des vitesses de flux de sève xylémienne bien supérieures aux espèces à porosité diffuse comme le pommier. Ces

dernières ont, quant à elles, une vitesse de flux supérieure à celles des arbres non poreux, comme chez le pin (Granier, 1977). Ces différences de flux peuvent aussi expliquer le fait que les colorants aient atteint une hauteur plus grande chez le châtaignier que chez le pommier et le pin, respectivement, 2,5 m, 1 m et quelques dizaines de centimètres. Bien que, chez le dernier, la large diffusion latérale, due à l'embranchement, semble limiter le transport vers le haut au profit d'un transport latéral dans les branches.

Les coupes au-dessus du point d'injection ont montré, chez le pommier, que les colorants étaient principalement transportés par les trois derniers cernes. Chez le châtaignier, les colorants se situent principalement dans le dernier cerne, et dans une moindre mesure dans l'avant-dernier cerne, alors que chez le pin, des colorations plus ponctuelles apparaissent au niveau de tous les cernes. Cela est cohérent avec les études sur la répartition des flux de sève dans les différentes espèces. En effet, chez les espèces à zones poreuses, environ 90% de la sève brute est transportée dans le dernier cerne de croissance alors que, chez les espèces à zones poreuses diffuses, il y a une meilleure répartition des flux entre les trois derniers cernes. Chez les conifères, un grand nombre de cernes restent actifs durant plusieurs années (Kozlowski, Hughes and Leyton, 1967; Chaney, 1986; Bush *et al.*, 2010; Allmen, Sperry and Bush, 2015).

Chez le pommier, le transfert est spiralé dans le sens des aiguilles d'une montre et l'angle de rotation est différent en fonction des cernes. Plus le cerne est à l'extérieur et plus la rotation est importante. Ce phénomène est rapporté par Kubler (1991) qui constate que la spirauté peut varier d'un cerne à l'autre et en fonction de besoins particuliers des branches. Acimović *et al.* (2014) a rapporté, à l'inverse, que le transfert après injection était spiralé dans le sens inverse des aiguilles d'une montre chez le pommier. Toutefois, cette spirauté peut changer de sens après quelques années (Kubler, 1991). Chez le châtaignier, le transfert hydrique, tel qu'observé dans nos expériences, était droit, desservant uniquement les zones se trouvant dans l'alignement des points d'injection. De plus, le sens de rotation pourrait différer d'une variété à l'autre ou même d'un arbre à l'autre (Kozlowski, Hughes and Leyton, 1967; Kubler, 1991). En effet, il existe différents types de mouvements : droit, spiralé dans le sens des aiguilles d'une montre ou dans le sens inverse et en zig-zag (Waisel, Liphshitz and Kuller, 1972; Tanis *et al.*, 2012). Le transfert spiralé, comme chez le pommier, pourrait permettre une meilleure diffusion latérale que le transfert droit, entraînant une distribution plus étendue dans le houppier (Kozlowski, Hughes and Leyton, 1967). Cela pourrait expliquer que, malgré une

localisation assez réduite de la zone de diffusion des colorants, nous pouvions obtenir une diffusion de l'imidaclopride dans l'essai en verger (chapitre 3). Cette diffusion, certes restreinte, permettait d'atteindre pratiquement l'ensemble du feuillage d'une charpentière à partir d'un seul point d'injection.

Dans l'ensemble, la dispersion des colorants reste plutôt localisée quelle que soit la trajectoire dans le tronc suivi, mais ces trois arbres présentaient des degrés de sectorisation différents. Peu de diffusion a été ainsi observée chez le pommier et le châtaignier. Dans les deux cas, il y a eu un peu de diffusion latérale au cours du transfert. Toutefois, le nombre de cernes efficaces pour le transfert semble plus grand chez le pommier (trois cernes) que chez le châtaignier (le cerne externe). En ce qui concerne le pin, la dispersion radiale est plus importante que chez les deux autres espèces et les colorants ont été redistribués par la présence de nœuds et en conséquence d'une plus grande intégration du système vasculaire (Ellmore, Zanne and Orians, 2018).

La plupart des arbres possèdent un système vasculaire sectorisé avec un faible nombre de bifurcations dans le réseau vasculaire (André, 2002; Hu and Wang, 2016). La diffusion latérale de l'eau est principalement due aux perforations latérales des vaisseaux qui font communiquer entre eux des vaisseaux adjacents. La sectorisation de la distribution de l'eau dans un arbre est liée à l'anatomie du système vasculaire et principalement à la taille des vaisseaux, à leur densité et à la présence des perforations (Zanne, Sharma and Orians, 2006). La présence de vaisseaux de grands diamètres avec une faible densité de vaisseaux par unité de surface entraîne une forte sectorisation, ce qui peut expliquer que le châtaignier semble être le plus sectorisé (Zanne, Sharma and Orians, 2006). Dans le cas de l'injection, la sectorisation va entraîner une distribution hétérogène des substances actives dans le feuillage, comme nous avons pu le montrer dans le chapitre précédent (chapitre 3) et comme l'ont aussi montré d'autres auteurs sur diverses espèces telles que l'oranger ou le frêne (Tanis *et al.*, 2012; Ácímović *et al.*, 2014; Hu and Wang, 2016). En effet, nous avons vu chez le pommier, que lorsqu'une branche est présente dans la trajectoire de l'injectât, celui-ci va intégralement dans cette branche. Ce phénomène est le résultat de la sectorisation et va ainsi entraîner une forte concentration dans une branche de l'arbre contrairement au reste de l'arbre.

Cette sectorisation et les différents mouvements de transfert devraient donc être à prendre en compte afin d'obtenir un traitement par injection le plus homogène possible.

La sectorisation pourra être contrée par une augmentation du nombre de points d'injection par arbre (Aćimović *et al.*, 2014).

3. Taux de transfert des molécules dans les feuilles et adsorption

Lors des expérimentations en verger, nous avons pu déterminer que certaines molécules, telles que le difénoconazole, n'étaient que faiblement transférées dans le feuillage, même longtemps après l'injection. Ce faible taux de transfert est à mettre principalement en relation avec la lipophilie des molécules. Depuis, les travaux de Briggs *et al.* (1982), il est connu que la lipophilie, estimée par le coefficient de partition octanol-eau, $\log K_{ow}$, est le principal paramètre contrôlant la mobilité des composés organiques dans la plante. En effet, ces composés doivent traverser par diffusion un certain nombre de couches lipidiques :

- la cuticule pour pénétrer dans les feuilles ;
- un périderme plus ou moins subérifié pour être absorbés par les racines
- ou la couche subéro-ligneuse des cadres de Caspary ;
- les membranes cellulaires de l'endoderme pour atteindre les vaisseaux du xylème et être transloqués vers les parties aériennes de la plante.

Leurs études avaient cependant été réalisées sur des plantes herbacées, telles que l'orge, le soja etc. En outre, l'injection permet de supprimer une partie de ces problèmes en atteignant directement le xylème. Néanmoins, la lignine, un polymère polyphénolique, est une des principales macromolécules constitutives des vaisseaux xylémiens. Elle a un fort pouvoir d'adsorption des composés organiques hydrophobes. De ce fait, les substances actives trop lipophiles peuvent être retenues sur la paroi des vaisseaux. Ce phénomène pourrait donc engendrer une réduction de leur transfert. Afin de caractériser ce point chez des essences ligneuses comme celles qui nous intéressent dans ce projet, nous avons dans un premier temps examiné le transfert de différentes molécules organiques, essentiellement des PPP, dans des branches excisées de pommier ou de pin. L'adsorption sur les vaisseaux du bois a aussi été caractérisée *in vitro* sur du bois broyé. L'adsorption des pesticides sur divers matériaux est largement étudiée dans le cadre du suivi de leur devenir dans l'environnement et en particulier leur adsorption sur le complexe argilo-humique du sol

qui conditionne leur transfert vers les réseaux hydriques. Des études plus spécifiques d'adsorption sur le bois ont été réalisées afin d'utiliser des résidus comme adsorbant dans un processus de dépollution (Calvet *et al.*, 2005; Rodriguez-Cruz *et al.*, 2007).

Dans cette partie, le transfert dans les branches excisées et l'adsorption *in vitro* sur le bois ont été testés avec cinq substances actives représentant une gamme de lipophilies et de solubilités dans l'eau différentes. Les trois molécules utilisées dans l'essai verger, imidaclopride, difénoconazole et pyriméthanil ont été testées ainsi qu'un autre fongicide, le tébuconazole. Ce dernier de la même famille que le difénoconazole a cependant une lipophilie cinq fois plus faible que lui. Une autre molécule organique a également été utilisée, le fluoranthène. Même s'il ne présente pas d'utilisation en tant que produit phytosanitaire, il a cependant l'avantage d'avoir un log K_{ow} élevé, supérieur à celui du difénoconazole. Les caractéristiques de ces molécules sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des molécules testées dans ce chapitre.

	Log P	Solubilité dans l'eau mg/L (température de mesure)
Imidaclopride	0,57	610 (20 °C)
Pyriméthanil	2,84	121 (25°C)
Tébuconazole	3,7	36 (20 °C)
Difénoconazole	4,36	15 (20°C)
Fluoranthène	5,16	0,26 (25°C)

D'autre part, l'effet de deux tensio-actifs (TA), le Tween[®] 20 (Polyéthylène glycol sorbitan monolaurate) et le SDS (Sodium dodécyl sulfate) a été évalué sur le transfert et l'adsorption de ces molécules. Ils font partie intégrante des agents de formulation des matières actives avec un triple effet : d'une part, dans le maintien de l'homogénéité de solutions concentrées de matière active ; d'autre part, ils participent à la qualité de dispersion et à l'étalement des gouttes de pulvérisation à la surface du feuillage ; et enfin, ils favorisent la pénétration foliaire des molécules au travers de la cuticule. Dans une préparation injectable, ils pourraient modifier aussi les caractéristiques de mobilité des composés dans le système vasculaire.

L'objectif de cette étude était de quantifier la mobilité des substances actives que nous avons utilisées dans l'essai en plein champ (chapitre 3) et leur éventuelle rétention ainsi que de tester l'intérêt de l'utilisation de tensio-actifs dans les préparations injectables pour améliorer le transfert de ces substances actives. Ces expérimentations ont été réalisées principalement sur pommier.

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Molécules :

Tous les produits chimiques non radiomarqués proviennent de chez Sigma-Aldrich (France). Les produits phytosanitaires étaient de qualité pestanal. Le [2-¹⁴C-imidazolidine]-imidaclopride (activité spécifique = 2015 MBq.mmol⁻¹, pureté radiochimique = 100 %), le [U-¹⁴C-triazole]-difenoconazole (activité spécifique = 1592 MBq.mmol⁻¹, pureté radiochimique = 96,79%), le [2-¹⁴C-pyrimidine]-pyrimethanil (activité spécifique = 1857 MBq.mmol⁻¹, pureté radiochimique = 100%) et le [U-¹⁴C-phenyl]-tébuconazole (activité spécifique = 1358 MBq.mmol⁻¹, pureté radiochimique = 99,23%) ont été fournis par Izotop (Budapest, Hongrie). Le [U-¹⁴C-benzyl]-fluoranthène (activité spécifique = 1609,5 MBq/mmol⁻¹, pureté radiochimique > 95%) a été obtenu chez Sigma-Aldrich (France).

3.1.2 Détermination de la radioactivité

La radioactivité des échantillons solides a été déterminée après combustion à l'oxidizer (Oxidizer 307 Packard, PerkinElmer, Courtaboeuf, France). Le ¹⁴CO₂ issu de la combustion est piégé dans un mélange de scintillation Permafluor-Carbosorb, 10:7, v/v (PerkinElmer LAS). Les échantillons liquides ont été directement mélangés à un cocktail de scintillation, UltimaGold (PerkinElmer LAS). Dans les deux cas, la radioactivité a été comptée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide Tri-carb® 2910TR (Packard, Canberra, Australia) pendant 5 min.

3.1.3 Matériel biologique

Pour les essais *ex vivo*, des branches provenant de pommiers de la variété Reinette du Canada ou de pins noirs d'Autriche ont été récoltées le jour de l'expérimentation. Leur extrémité a été plongée dans l'eau immédiatement après la taille, puis recoupée, afin d'éviter une embolie gazeuse des vaisseaux.

Pour les essais *in vitro*, des troncs de pommiers de la variété Royal Gala, vierges de toute injection, ont été récoltés. Les troncs ont été écorcés et les trois premiers cernes de bois collectés. Seules les zones exemptes de toutes traces de blessure étaient utilisées. Ces échantillons de bois ont ensuite été broyés dans un broyeur à billes de type Danguomeau et séchés à 60 °C durant 48 h. La finesse du broyage était de 9,4 µm.

3.1.4 Etude sur branches excisées

Le transfert de différentes molécules dans des branches excisées a été testé avec des solutions de substances actives soit pures, soit en mélange avec un tensio-actif, du Tween20®. Dans tous les essais, les branches ont été coupées sous l'eau à une longueur comprise entre 15 et 40 cm selon les expérimentations. Leur extrémité inférieure a été immédiatement plongée dans 1 ml contenant une des différentes molécules radiomarquées, imidaclopride, pyriméthanil, difénoconazole ou fluoranthène. Elles ont ensuite été placées dans une armoire climatique (photopériode jour/nuit 15 h/9 h, 25 °C/20 °C). Lorsque les branches ont absorbé 500 µl de solution, elles ont été déplacées dans des béchers contenant de l'eau distillée et remises en conditions contrôlées jusqu'à la récolte. La radioactivité non adsorbée a été quantifiée.

Ensuite les branches ont été récoltées entre 1 et 5 jours suivant l'expérimentation. Les feuilles ou les aiguilles et les tiges ont été collectées séparément. Les tiges ont ensuite été découpées en tronçons pour déterminer le transect de la distribution de la molécule dans la tige. Les échantillons de feuilles ou de tiges ont été séchés à 60 °C pendant 48 h puis broyés avec un broyeur à billes (MM 400, Retsch GmbH, Haan, Allemagne) et placés dans des cupules de combustion pour être brûlés à l'oxidizer afin de quantifier la radioactivité. Trois essais ont été réalisés :

- Protocole 1 : Transfert dans des branches de pommier en fonction de la hauteur des feuilles :

Trois gourmands de pommier d'environ 1 m de long ont été sectionnés en trois tronçons de 15 cm pour disposer de deux feuilles basses et deux feuilles hautes sur le même segment. Chaque tronçon a ensuite absorbé 1 mg/ml d'imidaclopride auquel a été ajouté 0,22 µCi de [¹⁴C]-imidaclopride (2,04 µg). Les feuilles ont été collectées après 48h.

- Protocole 2 : Transfert dans des branches de pommier ou de pin :

Deux sections de branches de pommiers de 40 cm ont été prélevées en extrémité de gourmands dont on n'a conservé que la rosette de feuilles terminales. Elles ont absorbé 1 ml de solution radiomarquée, soit 0,32 μCi de [^{14}C]-imidaclopride (3,01 μg) ou 0,52 μCi de [^{14}C]-fluoranthène (2,41 μg). Elles ont ensuite été mises dans de l'eau et récoltées après 5 jours.

De la même manière, trois extrémités de branches de pins de 15 cm avec seulement les aiguilles terminales ont absorbé 1 mL de solution avec 0,22 μCi de [^{14}C]-imidaclopride (2,04 μg) et 0,16 μCi de [^{14}C]-fluoranthène (0,75 μg). Les branches ont ensuite été découpées après 4 jours d'incubation dans l'eau.

- Protocole 3 : cinétique d'adsorption sur branche de pommier :

Pour cette expérimentation, une cinétique de transfert des substances actives seules ou avec du Tween20[®] (1%) a été réalisée sur des branches de pommiers de 15 cm de long avec des feuilles en position apicale. Ces branches ont absorbé 0,05 μCi de [^{14}C]-imidaclopride (0,49 μg), 0,43 μCi de [^{14}C]-pyriméthanol (1,70 μg) et 0,45 μCi de [^{14}C]-difénocazole (4,56 μg). La cinétique a été suivie pendant 3 jours. Chaque jour 4 branches ont été récoltées et les feuilles et tiges collectées séparément.

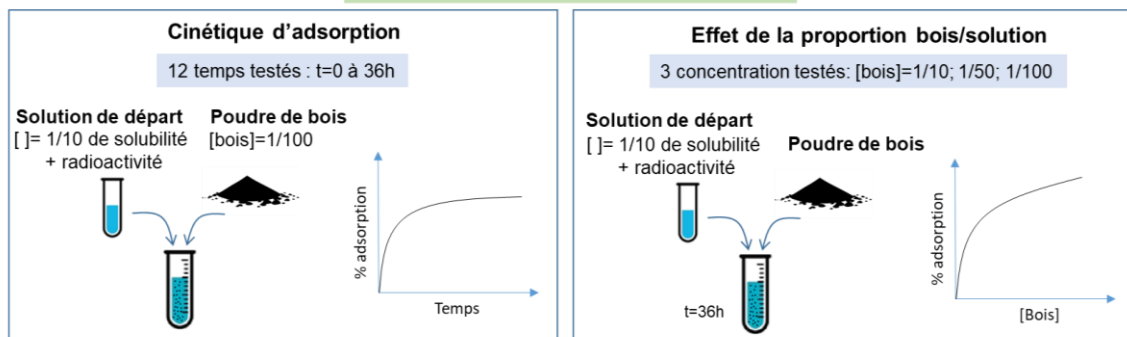
Les différences entre concentrations et quantités des facteurs mesurés ont été testées en utilisant une ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tuckey.

3.1.5 Etude de l'adsorption *in vitro*

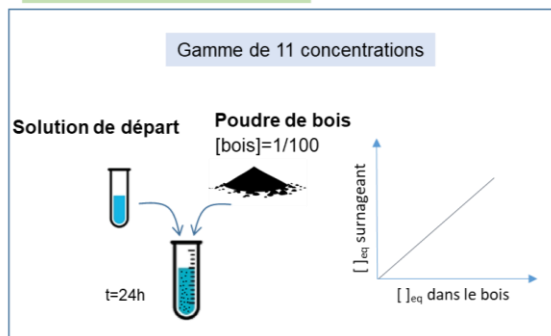
Les paramètres de sorption des quatre produits phytosanitaires ont été déterminés *in vitro* sur du bois de pommier. Une étude préliminaire a d'abord été nécessaire afin de fixer les paramètres expérimentaux optimaux de l'adsorption des molécules sur le bois (Figure 28).

3.1.5.1 Conditions expérimentales

1. Etude préliminaire : choix des paramètres



2. Adsorption des molécules



3. Impact des tensio-actifs

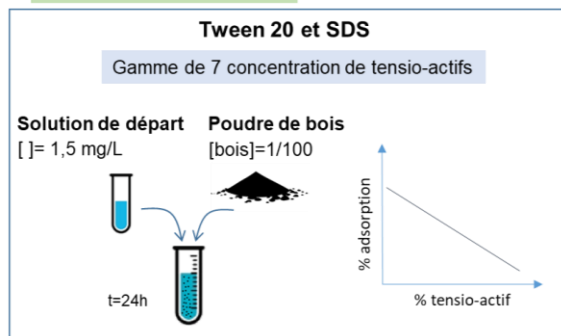


Figure 28 : Schémas des dispositifs expérimentaux utilisés pour étudier l'adsorption des substances actives dans le bois *in vitro*.

3.1.5.2 Protocole expérimental général :

La Figure 29 schématise le protocole expérimental général utilisé dans ces essais *in vitro*

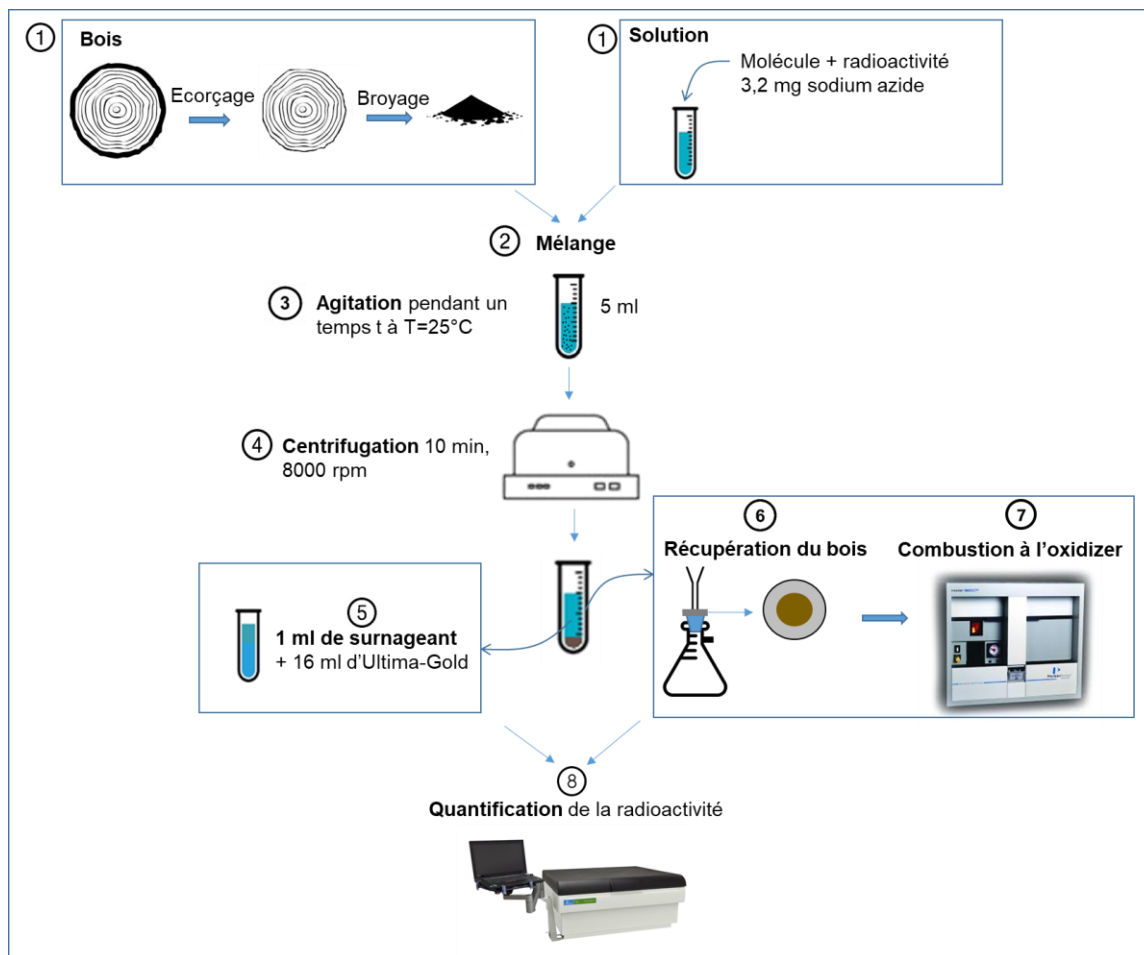


Figure 29 : Schéma du protocole expérimental utilisé pour étudier l'adsorption des substances actives dans le bois *in vitro*.

De 50 à 200 mg de bois ont été mis, dans des tubes Corex de 30 ml, en présence de 5 ml d'une solution de molécule radiomarquée contenant 3,2 mg d'azide de sodium, NaN_3 , pour empêcher la dégradation microbienne. Les tubes ont été agités à la température de 20°C sur un agitateur orbital (Modèle 3528-5CC, Lab Line Instruments Inc., Thermo Scientific, Illkirch, France) pendant un temps donné.

Après incubation, les tubes ont été centrifugés à 8 000 rpm pendant 10 min (Sigma 3-18K, Fisher Scientific, France) et 1 ml de la solution surnageante a été prélevé pour déterminer la concentration en substance active. Le reste de l'échantillon, surnageant et résidu solide, a été filtré sur un filtre en fibre de verre GF/A de 25 mm de diamètre

(Whatman, GE Healthcare, USA). La galette de filtration était récupérée, sans lavage préalable pour éviter la désorption des molécules, dans une cupule de combustion puis séchée au four pendant 48 h à 60 °C. La radioactivité de chaque échantillon était ensuite déterminée après combustion à l'oxidizer.

3.1.5.3 Détermination des paramètres expérimentaux

La cinétique d'adsorption et l'impact de la proportion d'adsorbant, le bois, sur le taux d'adsorption ont été déterminés afin de sélectionner les paramètres expérimentaux optimaux, temps d'incubation et rapport bois/solution de substance active (Figure 28). Ces essais préliminaires ont été conduits avec les deux molécules possédant les log P les plus extrêmes, le difénoconazole (K_{ow} : 4,36) et l'imidaclopride (K_{ow} : 0,57). Des solutions aqueuses de ces substances ont été préparées au 1/10^{ème} de leur solubilité (Tableau 1), soit 61 mg/l pour l'imidaclopride et 1,5 mg/l pour le difénoconazole. 0,03 µCi de [¹⁴C]-imidaclopride et 0,02 µCi de [¹⁴C]-difénoconazole ont été ajoutées aux solutions précédentes. Durant la cinétique, la proportion en bois a été fixée à 1/100 (m/v) dans un volume de 5 ml, soit 50 mg de bois et les temps variaient de 0 à 36 h.

Pour déterminer le rapport entre bois et volume de solution, trois proportions bois/volume ont été testées : 1/100 ; 1/50 ; 1/10, avec un volume fixe de 5 ml de solution test. Le temps d'adsorption a été fixé à 36 h.

3.1.5.4 Détermination des paramètres de sorption

Suite aux essais préliminaires, les paramètres expérimentaux ont été fixés à un ratio bois/solution de 1/100, pour un temps d'adsorption de 24 h.

Les concentrations initiales des quatre molécules sont données dans le Tableau 2. Pour chaque molécule, une quantité constante de radioactivité a été rajoutée dans chaque tube d'essai, soit 0,035 µCi de [¹⁴C]-imidaclopride, 0,021 µCi de [¹⁴C]-pyriméthanil et de [¹⁴C]-tébucanazole et 0,012 µCi [¹⁴C]-difénoconazole.

Tableau 2 : Gamme de concentrations des solutions d'exposition initiales du bois pour les 4 molécules testées.

Concentrations, mg/L			
Difénoconazole	Tébuconazole	Pyriméthanil	Imidaclopride
10	10	60	300
5	5	30	100
1,5	1,5	16	60
1	1	8	15
0,6	0,6	4	6
0,4	0,4	2	2,5
0,25	0,25	1	1
0,125	0,125	0,5	0,4
0,075	0,075	0,1	0,15
0,04	0,04	0,04	0,04
0,015	0,015	0	0
0	0		

Pour mesurer la capacité de désorption du difénoconazole, une première phase d'adsorption a été réalisée à la concentration de 1,5 mg/L sur 18 échantillons. Après cette phase d'adsorption, les échantillons ont été centrifugés et la solution d'équilibre diluée, trois tubes par trois tubes, du 1/2 au 1/32^{ème} avec de l'eau distillée. Les échantillons ont alors été remis en suspension et agités durant 24 h, puis les concentrations à l'équilibre final ont été déterminées dans les phases solides et liquides comme précédemment.

3.1.5.5 Impact des tensio-actifs sur l'adsorption

L'effet des tensio-actifs sur la rétention de ces molécules sur le bois a ensuite été déterminé. Deux TA, choisis pour leurs caractéristiques tensioactives différentes, ont été testés. Le Tween 20[®] est un TA neutre et SDS un TA anionique dont les concentrations micellaires critiques (CMC) sont respectivement 0,059 et 7 mM.

Ces essais ont été réalisés avec une concentration fixe pour chaque substance active, soit 1,5 mg/L pour le pyriméthanil, le tébuconazole et le difénoconazole, avec les mêmes quantités de radioactivité, pour la même concentration en bois et un temps d'adsorption identique à précédemment.

Le pourcentage en tensio-actifs, SDS et Tween 20[®], dans les solutions testées variait de 0,01% à 1%, (masse/volume) avec 0% de TA dans la solution de contrôle.

3.1.5.6 Analyse des données

Les isothermes d'adsorption, concentration à l'équilibre dans le bois en fonction de la concentration à l'équilibre dans la solution, ont été tracées à l'aide du package *Sorption Analysis* pour l'environnement R (<https://www.r-project.org/>) selon la formalisation linéaire de Freundlich avec l'équation suivante :

$$\log C_s = \log K_F + n_F \log C_e$$

où C_s est la concentration à l'équilibre de substances actives adsorbées dans le bois ; C_e la concentration à l'équilibre dans la solution ; n_F le coefficient de puissance et K_F la constante de Freundlich, ces deux derniers calculés respectivement à partir de la pente et de l'interception à l'ordonnée.

3.2 Résultats et discussion

3.2.1 Transfert des *substances actives* dans des branches excisées

Dans un premier temps, des études préliminaires ont été réalisées avec des molécules organiques disponibles au laboratoire, l'imidaclopride et le fluoranthène.

En plein champ, les essais d'injection de différentes substances actives ont montré dans de nombreux cas que les concentrations retrouvées dans le feuillage étaient souvent supérieures dans les parties basses de l'arbre que dans les feuilles situées dans la partie supérieure du houppier. Pour essayer de comprendre ce phénomène, nous avons mené un essai sur des branches excisées découpées en trois sections (protocole 1). La Figure 30 montre les concentrations retrouvées dans les feuilles du bas et du haut de chaque tronçon.

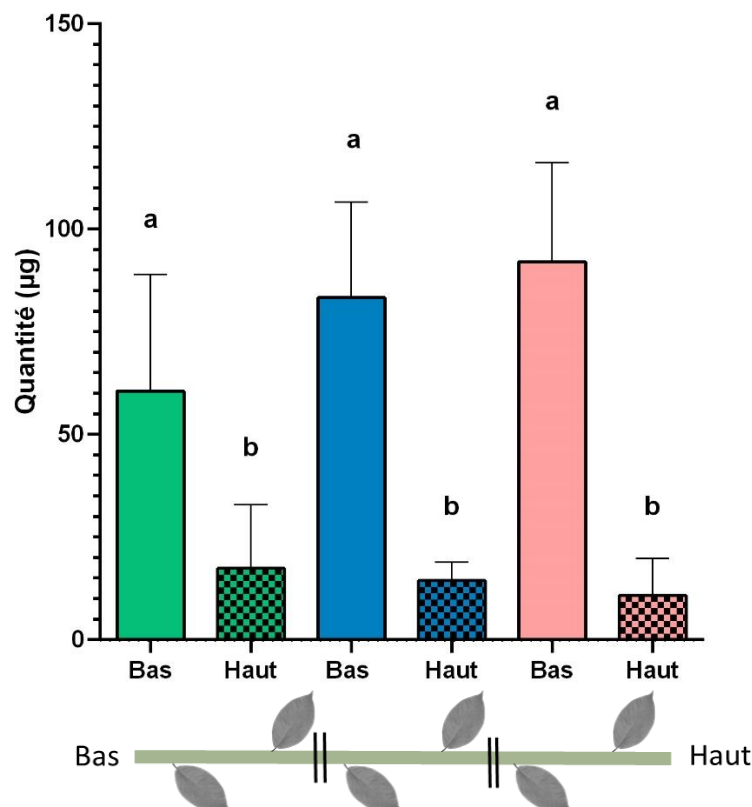


Figure 30 : Quantités d'imidaclopride absorbées dans les feuilles par trois sections successives de branches de pommier en fonction de la hauteur des sections et de la position des feuilles sur le egment, exprimée en µg. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standart. Les lettres inscrites au dessus des batons indiquent les différences significatives entre les échantillons, (p-value<0,05). n=3.

Les résultats montrent que, quelle que soit la hauteur de prélèvement d'un tronçon sur une branche, les feuilles situées en position basse du tronçon absorbent 5 à 10 fois plus d'imidaclopride que les feuilles situées en haut du même tronçon. De manière *a priori* contradictoire, les feuilles basses des segments supérieurs semblent absorber environ 50% d'imidaclopride en plus que celles du segment inférieur. Ce qui n'est pas retrouvé pour les feuilles supérieures. Or, à cause de la croissance des branches, plus une feuille se situe vers l'apex d'une branche, plus elle est jeune.

Le degré de maturité des feuilles modifiant leur taux d'évapotranspiration et ce dernier étant le moteur du transfert acropétale de l'imidaclopride dans la plante, nous avons dans une expérimentation complémentaire mesuré le taux de transpiration de feuilles de maturité différentes, feuilles du bas de la branche versus feuilles de l'apex.

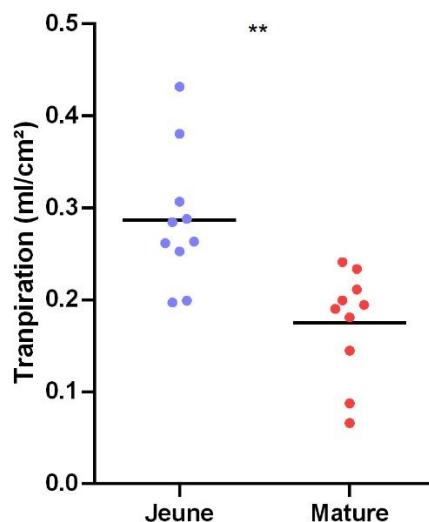


Figure 31 : Transpiration en ml/cm² dans les feuilles jeunes et matures. ** indique une différence significative (T-Test, p-value<0,01).

La Figure 31 montre que les feuilles les plus jeunes ont un taux de transpiration environ 50% plus élevé que les feuilles plus matures. Cette différence de maturité des feuilles et de leur transpiration expliquerait l'augmentation des quantités et des concentrations retrouvées entre les différents tronçons.

Néanmoins, l'évapotranspiration ne peut expliquer pourquoi, sur un même tronçon, les feuilles du bas accumulent plus d'imidaclopride que les feuilles du haut. Il semblerait donc que ce soit essentiellement la position basale d'une feuille par rapport à une autre et non leur état physiologique qui conditionne une accumulation préférentielle. Ces feuilles capteraient physiquement plus d'imidaclopride que les feuilles en position plus apicale.

Dans le cas des arbres entiers, on peut penser que les feuilles les plus hautes sur une branche, se développant plus tardivement, parfois bien après l'injection, sont donc exposées durant une plus courte période aux molécules injectées. Or dans le cas de nos essais au champ, nous avons défini les zones basses et hautes en fonction de la hauteur de l'insertion des branches sur les charpentières et non pas en fonction d'une altitude du feuillage. Nous avons ensuite collecté les feuilles sur ces branches sur toute leur longueur, mélangeant ainsi des feuilles de maturités différentes. La différence de maturité des feuilles ne peut donc expliquer les différences de concentrations observées au champ entre bas et haut des arbres. En revanche, nous avons observé que les branches hautes avaient un

feuillage plus fourni que les branches basses. Le volume foliaire plus important pourrait provoquer un phénomène de dilution.

Autre point qui semble devoir être pris en considération, la distance entre la source, le point d'injection, et le puit, la feuille. La rétention des molécules le long du parcours dans les faisceaux ligneux pourrait être aussi une explication de l'accumulation préférentielle dans les feuilles basses d'une tige ou de l'arbre.

Dans un second temps, cette rétention dans les branches a été testée (protocole 2) pour deux molécules, l'imidaclopride et le fluoranthène, de lipophilie très différente. Ces résultats sont présentés dans la Figure 32.

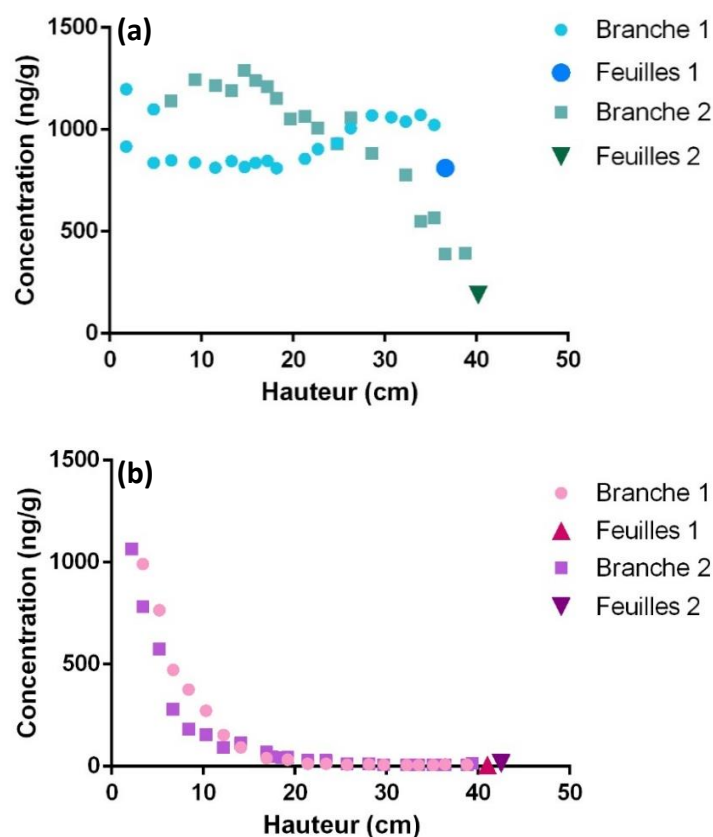


Figure 32 : Concentrations, exprimées en ng/g, d'imidaclopride (a) et de fluoranthène (b) dans les feuilles apicales et dans des tronçons de tiges en fonction de la hauteur de migration, après absorption de ces molécules par des branches excisées de pommier. NB, Le segment de tige trempant dans la solution a préalablement été retiré.

Les concentrations en imidaclopride varient relativement peu (de 1 à 3) le long de la tige à l'inverse de celles du fluoranthène qui forment, pour ce dernier, un gradient acropétale très marqué. Elles sont élevées près de l'extrémité basale et diminuent

drastiquement sur les 10 premiers cm pour atteindre des concentrations très faibles en haut de branche (100 fois inférieure à la base) et un transfert très faible dans les feuilles. Le fluoranthène est donc retenu sur le bas de la branche alors que l'imidaclopride est facilement transférée.

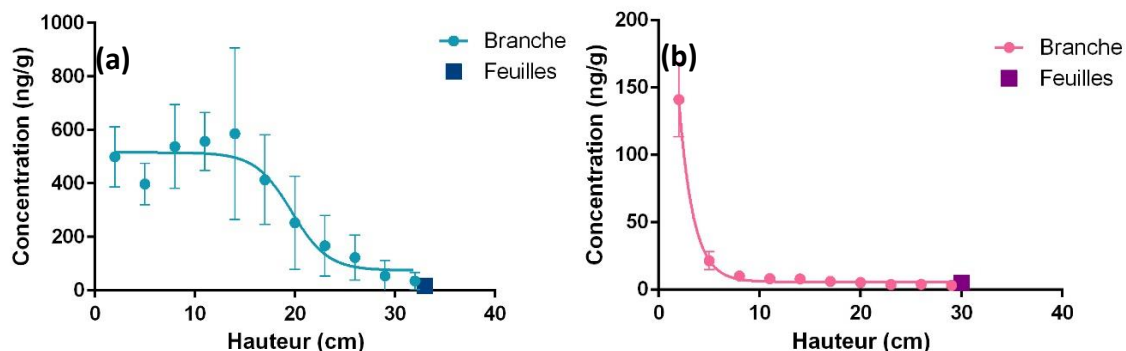


Figure 33 : Concentrations, exprimées en ng/g, d'imidaclopride (a) et de fluoranthène (b) et dans les aiguilles et dans des tronçons de tiges en fonction de la hauteur de migration, après absorption de ces molécules par des branches excisées de pin. NB, le segment de tige trempant dans la solution a été retiré. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur standard. n=3.

On retrouve le même type de résultats sur des branches excisées de pin (Figure 33). Chez le pin, la concentration en imidaclopride est constante jusqu'à environ 15 cm de hauteur puis diminue pour atteindre des concentrations faibles en haut de la branche et dans les aiguilles. En revanche, comme chez le pommier, la concentration en fluoranthène diminue drastiquement dans les premiers centimètres pour atteindre à l'apex des concentrations environ 40 fois plus faibles.

Les très faibles concentrations observées au champ avec le difénoconazole (chapitre 2) pourraient donc être expliquées par un phénomène de rétention de cette molécule dans le bois, comme c'est le cas avec le fluoranthène, toutes deux étant des molécules très lipophiles.

Par ailleurs, il est connu que les molécules tensio-actives ont la propriété de réduire l'adsorption de composés lipophiles sur des matériaux eux-mêmes lipophiles, tels que le bois. Nous avons donc étudié la cinétique de transfert de l'imidaclopride, du difénoconazole et du pyriméthanil (fongicide de lipophilie intermédiaire aux deux premières substances actives) en présence ou non d'un tensio-actif, le Tween20®. Ces résultats sont présentés dans la Figure 34.

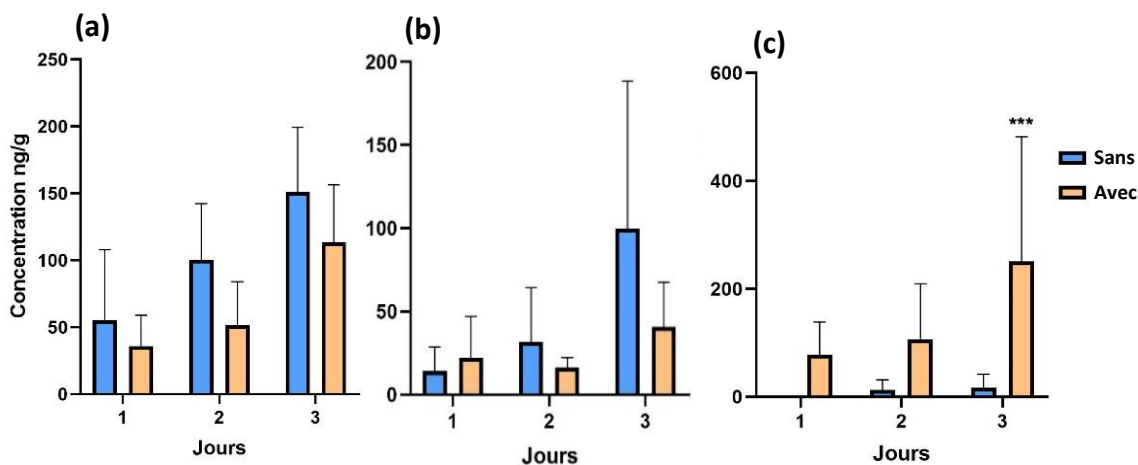


Figure 34 : Cinétique d'adsorption de différentes substances actives dans les feuilles après absorption par des branches excisées de pommier, en présence ou non de Tween 20 dans la solution d'adsorption. (a) imidaclopride ; (b) pyriméthanal ; (c) difénoconazole. Les résultats sont exprimés en ng/g en fonction du nombre de jours. n=4. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur standard. * indique une différence significative (p-value<0,001).**

La concentration en imidaclopride s'élève rapidement dans les feuilles, avec un pourcentage de transfert de 51% en 3 jours (Tableau 3). Le difénoconazole est très peu transféré, inférieur à 1% en 3 jours et le pyriméthanal présente un transfert intermédiaire, mais quand même relativement faible (Tableau 3). Ces différences peuvent être expliquées par les différences de lipophilie entre les molécules. En effet, les molécules lipophiles peuvent être retenues sur la lignine des vaisseaux de xylème (Mackay and Gschwend, 2000). Ce serait donc le cas du difénoconazole qui est très lipophile.

L'ajout de Tween 20[®] améliore significativement le transfert du difénoconazole (p-value <0,001) puisque celui-ci est multiplié par 7,5 à trois jours. En revanche, il semble avoir un effet légèrement négatif, toutefois non significatif (p-value > 0,05), sur le transfert de l'imidaclopride et du pyriméthanal. L'ajout de tensio-actif réduit donc, comme espéré, la rétention des molécules lipophiles, améliorant leur transfert. Cependant, pour des molécules plus hydrophiles, le tensio-actif pourrait avoir un effet contraire, réduisant leur transfert.

Tableau 3 : Pourcentage de transfert dans les feuilles des substances actives en présence ou non de Tween 20® (Tw20) dans la solution d'adsorption après 3 jours et pourcentage de variation du transfert.

	Transfert %		Variation de l'adsorption %
	0% de Tw20	1% de Tw20	
Imidaclopride	51,86	39,14	-24,5
Pyriméthanil	5,07	3,92	- 22,7
Difénoconazole	0,78	5,89	+ 655

L'effet du Tween 20® est aussi remarquable sur le gradient dans la tige, avec des concentrations plus élevées en présence de Tween 20® (Figure 35). Comme pour le fluoranthène, le difénoconazole est faiblement transféré vers le haut de la branche, il y a une forte rétention en bas. L'ajout de Tween 20® a permis l'augmentation des concentrations dans les tiges, comme dans les feuilles et le gradient dans les tiges est moins marqué. Le tensio-actif favoriserait donc l'adsorption en limitant la rétention du difénoconazole sur le bois.

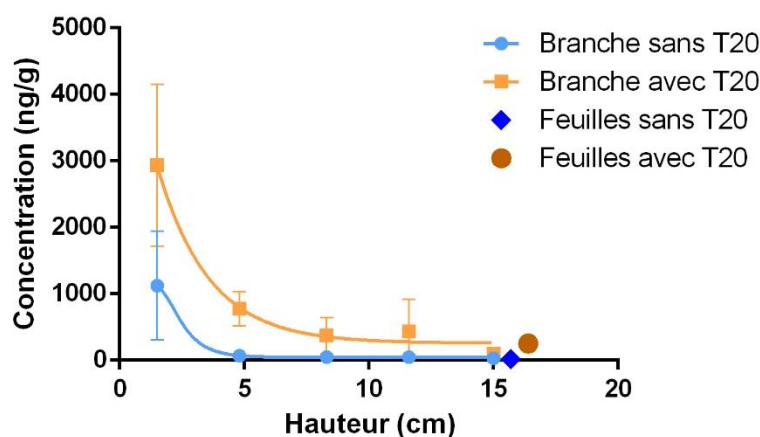


Figure 35 : Concentrations, exprimées en ng/g, de difénoconazole dans des tronçons de tige et dans les feuilles en fonction de la hauteur de migration, après absorption de ces molécules par des branches excisées de pommier sans ou avec 1% de Tween 20® dans la solution d'absorption. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur standart. n=4.

3.2.2 Adsorption *in vitro* des substances actives sur le bois

3.2.2.1 Paramètres expérimentaux :

La cinétique d'adsorption réalisée avec l'imidaclopride et le difénoconazole, montre que la saturation de l'adsorption sur le bois est atteinte relativement rapidement pour les deux molécules (Figure 36). Cela a aussi été rapporté pour les cinétiques d'adsorption de l'imidaclopride et du pyriméthanil sur différents types de sols (Capri *et al.*, 2001). Le pourcentage d'adsorption maximal est atteint au bout d'une heure avec l'imidaclopride et 3 h avec le difénoconazole. Cela est probablement dû à la finesse suffisante de la mouture du bois pour permettre une diffusion rapide des molécules dans l'adsorbant. Par sécurité, dans nos expérimentations futures, un temps de 24 h d'incubation a été choisi. Ces résultats montrent cependant une différence de comportement entre les deux molécules. Comme nous pouvions le supposer, une plus forte adsorption du difénoconazole est notée, avec un pourcentage d'adsorption moyen de 95%. En revanche, seulement 21% du taux initial d'imidaclopride est adsorbé sur le bois.

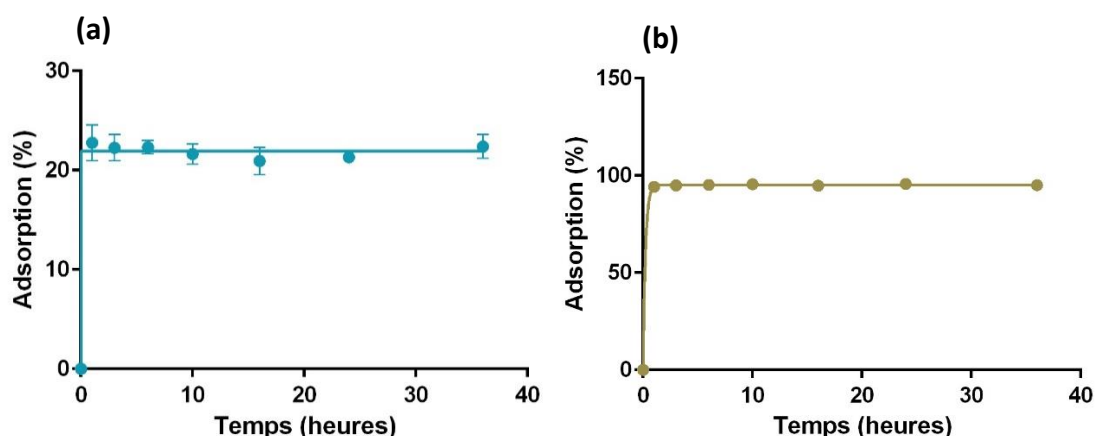


Figure 36 : Cinétique d'adsorption sur du bois de pommier de (a) l'imidaclopride et (b) du difénoconazole, exprimée en pourcentage d'adsorption.

De plus, différentes concentrations d'adsorbant ont été testées avec le difénoconazole. Le pourcentage d'adsorption augmente légèrement, mais significativement, lorsque la proportion de bois augmente, passant de 94,2% de difénoconazole adsorbés avec un ratio de 1/100 de bois (m/v) à 97,6% avec 1/25 de bois (p-value <0,05). Les pourcentages d'adsorption étant très élevés même à la plus faible concentration en difénoconazole, la proportion 1/100 a été conservée pour la suite des essais.

3.2.2.2 Paramètres d'adsorption

Les isothermes d'adsorption des quatre substances actives selon le formalisme de Langmuir ($q_a f(C_e)$) sont présentées dans la Figure 37.

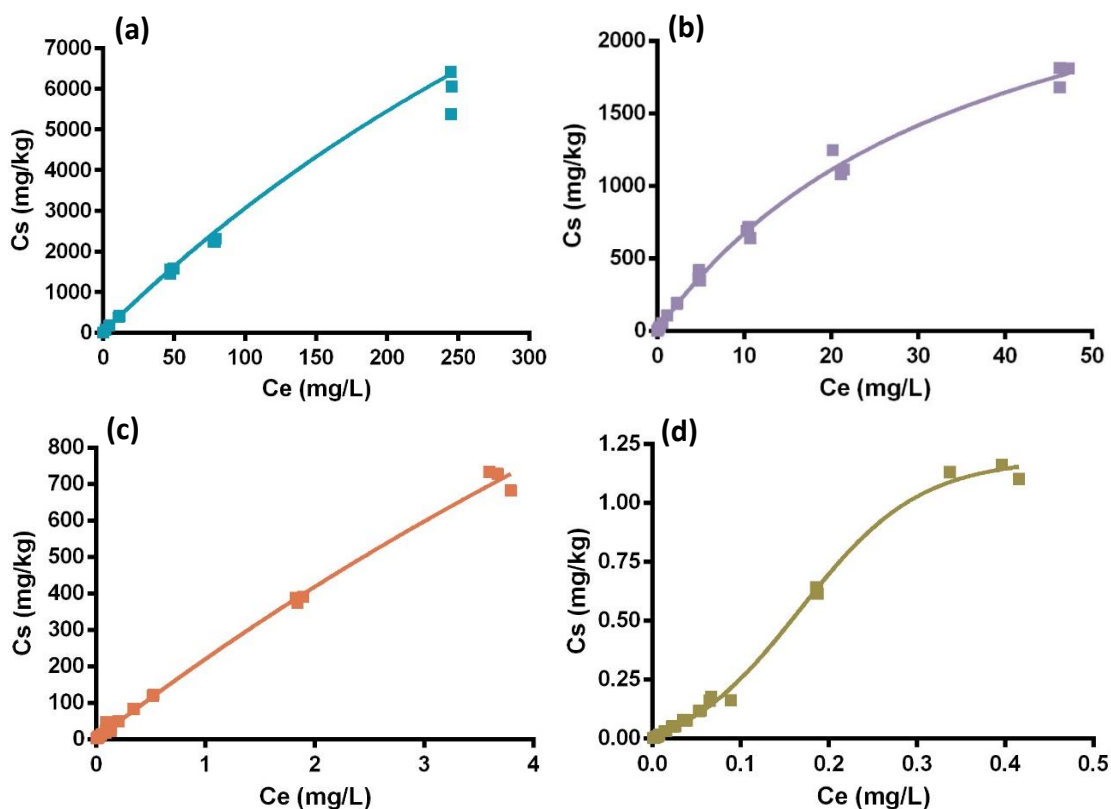


Figure 37 : Isothermes d'adsorption des substances actives sur le bois de pommier, selon la formulation de Langmuir pour (a) l'imidaclopride, (b) le pyriméthanil, (c) le tébuconazole, (d) le difénoconazole. C_e : concentration à l'équilibre de la solution d'adsorption, exprimée en mg/L ; C_s : concentration à l'équilibre sur le bois, exprimée en mg/kg.

L'utilisation du modèle de Freundlich a permis de linéariser les isothermes d'adsorption de chacune des molécules (Figure 38) avec des coefficients de corrélation élevés ($R^2 > 0,992$). Le Tableau 4 donne les coefficients d'adsorption K_F et n_F calculés selon ce modèle.

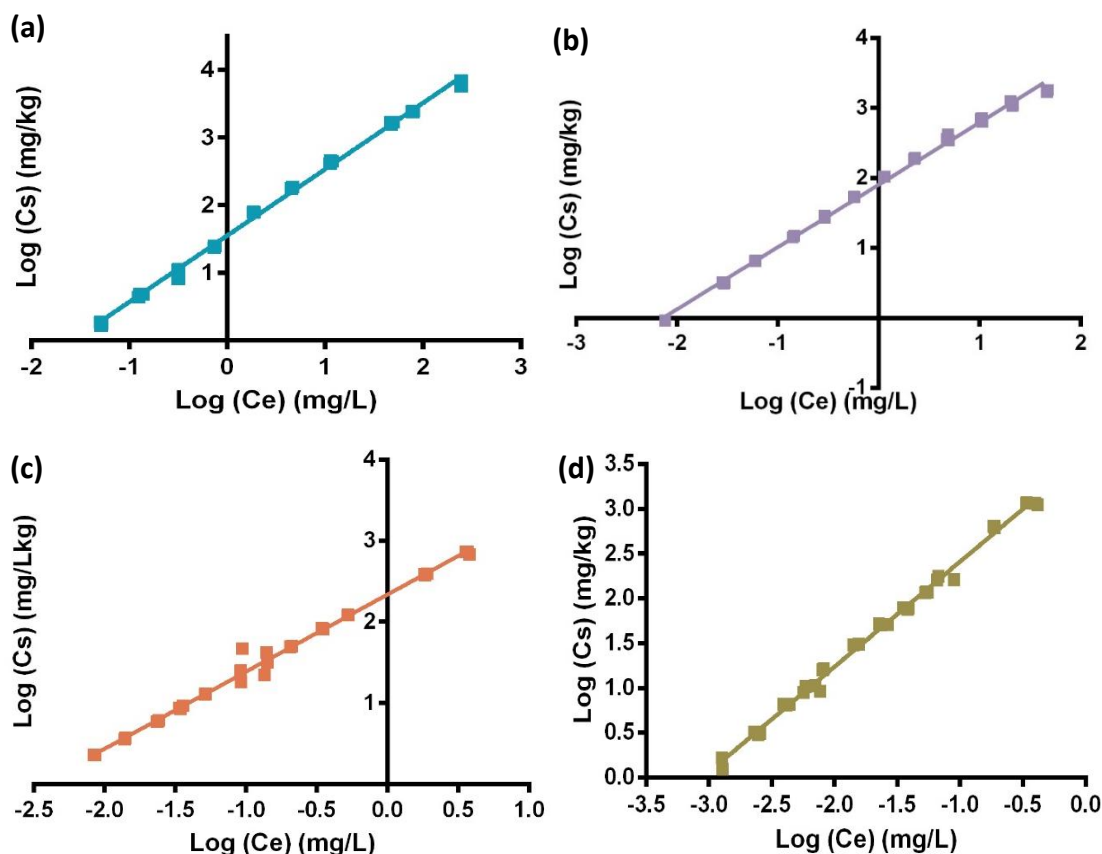


Figure 38 : Isothermes d'adsorption des substances actives sur le bois de pommier, linéarisées selon la formulation de Freundlich, (a) imidaclopride ; (b) pyriméthanal ; (c) tébuconazole et (d) difénoconazole, . Ce : concentration à l'équilibre de la solution d'adsorption, exprimée en mg/L ; Cs : concentration à l'équilibre sur le bois, exprimée en mg/kg.

Tableau 4 : Constantes d'adsorption des quatre molécules calculées après linéarisation selon la formulation de Freundlich de l'isotherme d'adsorption sur du bois de pommier.

	$K_F, L^{n_F} \cdot \text{mg}^{(1-n_F)} \cdot \text{kg}^{-1}$	n_F	R^2
Imidaclopride	43,95 ($\pm 1,03$)	0,904 ($\pm 0,009$)	0,9987
Pyriméthanal	80,35 ($\pm 1,02$)	0,89 ($\pm 0,009$)	0,9963
Tébuconazole	218,27 ($\pm 1,039$)	0,952 ($\pm 0,014$)	0,9925
Difénoconazole	3863 ($\pm 1,06$)	1,174 ($\pm 0,014$)	0,9950

Les isothermes d'adsorption, montrent un comportement différent des molécules entre elles. Imidaclopride, pyriméthanal et tébuconazole présentent des isothermes d'adsorption hyperboliques, selon l'équation de Langmuir ($q_a f(Ce)$) tandis que celle du difénoconazole

est sigmoïdale (Figure 37). Nous sommes donc en présence de deux types d'isothermes d'adsorption répondant, d'après la classification de (Giles *et al.*, 1960), à respectivement un type L et un type S. Cela signifie, dans le cas des trois premières molécules, que l'énergie d'adsorption ΔU_{ad} est indépendante de la concentration en substance active. Bien que leur coefficient n_F soit inférieur à 1 (Tableau 4), nous sommes bien dans une classe L car la pente à l'origine dans la représentation de Langmuir n'est pas infinie (Figure 37). On peut penser que l'imprécision des mesures, ou de l'expérimentation, due à un trop faible nombre de points de mesure, n'a pas permis d'apporter une précision suffisante pour calculer la bonne valeur de n_F , plus proche de 1 dans le cas d'isotherme de type L. En revanche, l'adsorption du difénoconazole est dépendante de sa concentration dans le milieu, l'énergie de liaison ΔU_{ad} diminuant avec l'augmentation de la concentration dans le milieu. Les concentrations élevées en difénoconazole favoriseraient son adsorption sur le bois de pommier.

Le plus faible coefficient K_F est obtenu avec l'imidaclopride qui est donc la molécule la moins adsorbée. Elle est suivie, dans l'ordre, par le pyriméthanil, puis le tébuconazole et enfin le difénoconazole qui présente le K_F le plus élevé. Plus les molécules sont lipophiles, plus leur K_F est élevé, ceci toutefois dans une relation non linéaire, mais qui permet tout de même de prédire l'adsorption des molécules (Figure 39). Ceci est cohérent avec les résultats trouvés dans la partie précédente où la rétention des molécules dans les vaisseaux et leur translocation dans les tiges sont en relation inverse avec leur lipophilie. Cette capacité d'adsorption sur le bois est en accord avec les travaux de Rodriguez-Cruz *et al.* (2008, 2007) qui montrent une corrélation positive entre le $\log K_{ow}$ des molécules et leur K_F pour leur adsorption sur le bois de différentes essences. Contrairement à ces travaux, dans le cas de l'injection, il sera donc important de sélectionner des molécules phytosanitaires avec des K_F ou des K_{ow} les plus faibles possibles afin de favoriser leur translocation dans les arbres, et ce même si l'injection permet d'outrepasser un certain nombre de barrières biologiques.

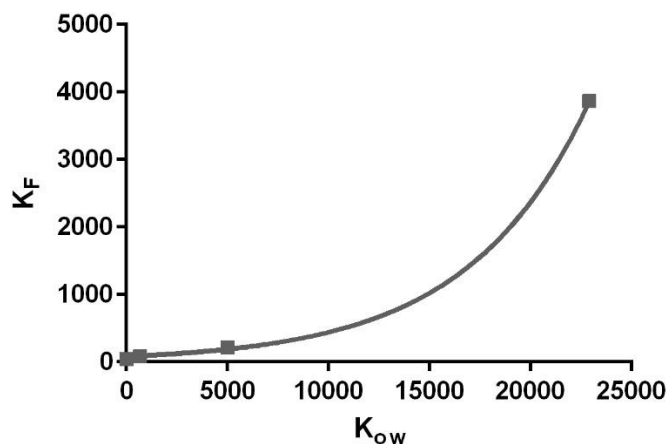


Figure 39 : Relation en le coefficient K_F et le K_{ow} . K_f calculé à partir des isothermes de Freundlich ; K_{ow} extrait de la littérature.

L'adsorption d'une molécule sur le bois peut potentiellement être réversible si la solution qui baigne le substrat voit sa concentration diminuer après l'équilibre d'adsorption. Une fraction de la molécule adsorbée sur le substrat est relarguée dans le milieu, il s'agit du phénomène de désorption (Calvet *et al.*, 2005). Ainsi, les substances actives adsorbées dans les vaisseaux de bois pourraient être relarguées dans le flux de sève lorsque l'injectât a été dissipé. Ce phénomène a été évalué pour le difénoconazole et le pyriméthanil. Les concentrations en difénoconazole adsorbées sur le bois restent constantes malgré des dilutions successives du milieu (Figure 40 a). Seulement 3% de la molécule sont désorbés malgré la dilution au 1/32^{ème}. Ce phénomène d'hystérésis montre que l'adsorption du difénoconazole sur le bois est pratiquement irréversible. A l'inverse, la pente de l'isotherme de désorption du pyriméthanil est voisine de celle de l'adsorption, le phénomène est donc presque totalement réversible (Figure 40 b). Après l'injection, même si une partie du pyriméthanil s'adsorbe sur les vaisseaux, il sera aisément désorbé de la surface des vaisseaux par le flux de sève pour être entraîné vers les feuilles par celui-ci alors que le difénoconazole restera adsorbé et non disponible pour son action dans le feuillage.

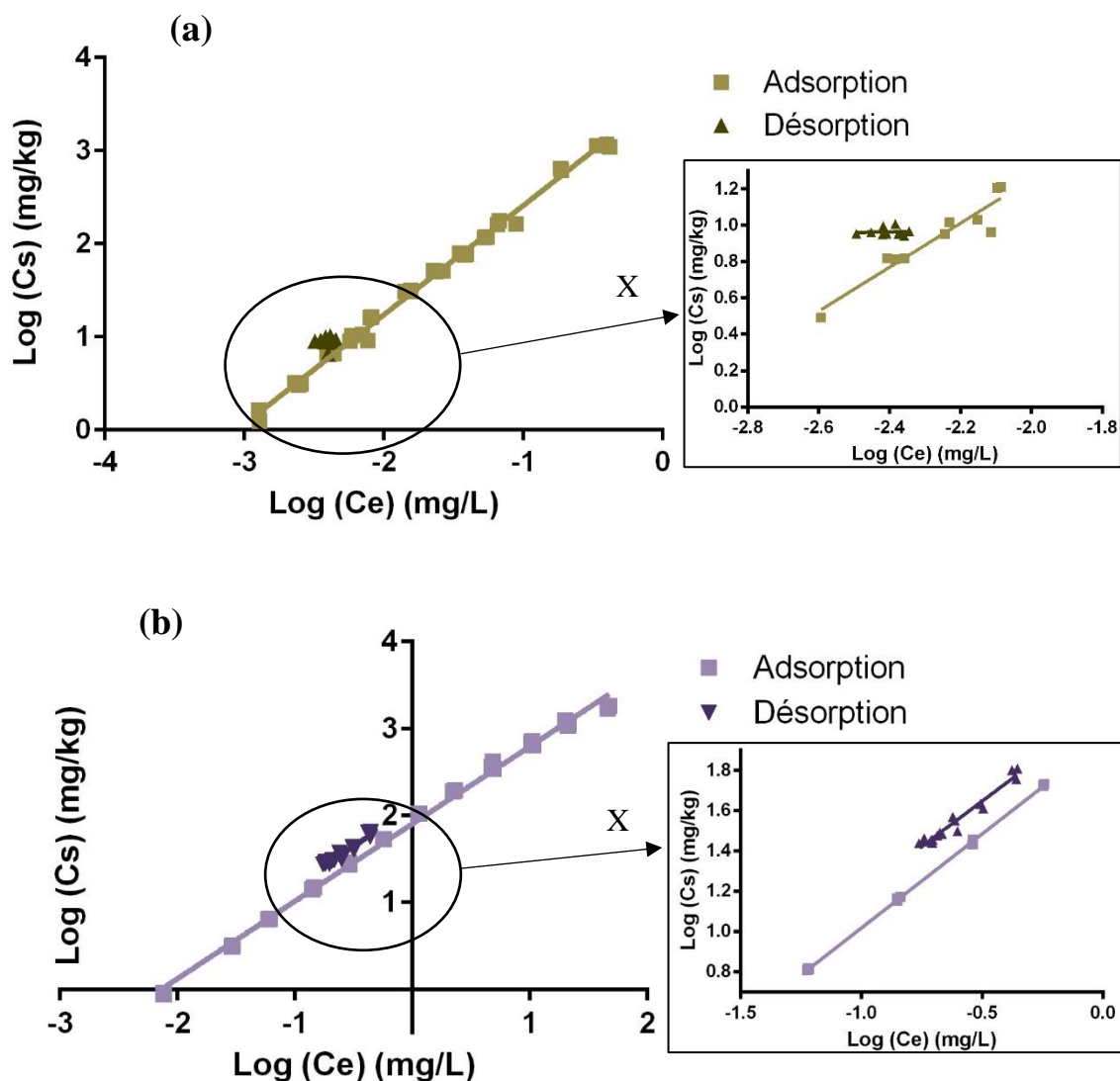


Figure 40 : Isothermes d'adsorption et de désorption, linéarisées selon la formulation de Freundlich, de (a) le difénoconazole et (b) le pyriméthanil sur du bois de pommier. C_e : concentration à l'équilibre de la solution d'adsorption, exprimée en mg/L ; C_s : concentration à l'équilibre sur le bois, exprimée en mg/kg.

3.2.2.3 Impact des tensio-actifs

Nous avons montré précédemment que la rétention par adsorption des substances actives sur la paroi des vaisseaux est un des facteurs limitant la translocation de ces substances dans les tiges. Cette interférence peut être objectivement réduite par l'ajout de molécules tensio-actives dans la préparation d'injection. Celles-ci seront de toute façon déjà présentes dans les formulations pour permettre une concentration élevée de substance active dans l'injectât et leur stabilité. Nous avons donc testé l'impact de deux TA de propriétés différentes sur la rétention dans le bois de pommier des quatre molécules étudiées.

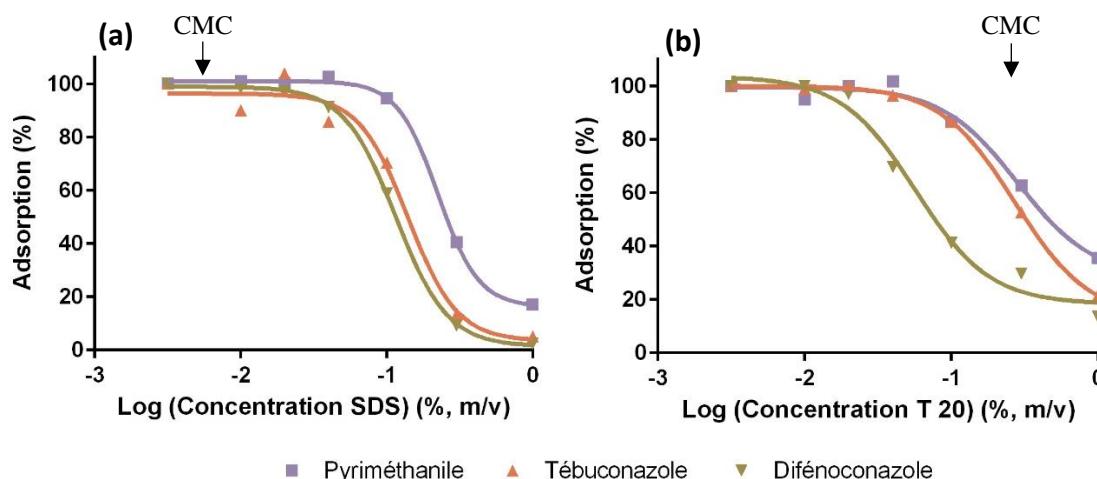


Figure 41 : Evolution du taux d'adsorption du piryméthanile, du tébuconazole et du difénoconazole sur du bois de pommier en fonction du pourcentage (m/V) de TA dans la solution. A : SDS ; B : Tween20®. Les flèches indiquent la CMC des TA.

La Figure 41 montre le pourcentage d'adsorption des substances actives dans le bois en fonction du pourcentage en tensio-actif dans la solution, exprimé en log. Les deux tensio-actifs réduisent l'adsorption des molécules sur le bois pour des concentrations pondérales similaires, avec des concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀) du même ordre de grandeur, entre 0,05% et 0,28%.

Tableau 5 : Constante d'inhibition 50 (IC₅₀) de l'adsorption des substances actives sur le bois de pommier par les TA et Constante de Hill (pente de la tangente au point d'inflexion) des courbes dose-effet.

	CI ₅₀ , % TA		Constante de Hill, L/g	
	SDS	Tw20	SDS	Tw20
Pyriméthanil	0,224 (0,024)	0,281 (0,248)	-3,12 (0,26)	-1,68 (0,58)
Tébuconazole	0,140 (0,091)	0,271 (0,034)	-2,57 (0,97)	-1,70 (0,10)
Difénoconazole	0,115 (0,008)	0,057 (0,039)	-2,44 (0,14)	-1,71 (0,53)

Toutefois, comme l'indiquent les pentes des courbes dose/effet (Tableau 5, coefficient de Hill), SDS et Tween 20® semblent agir de façon différente. En effet, l'inhibition de

l'adsorption semble plus précoce avec le Tween 20[®], c'est-à-dire à des concentrations plus faibles que pour le SDS. En revanche, ce dernier semble *in fine* plus efficace avec une inhibition totale de l'adsorption à des concentrations moindres. Il faut noter que ces dernières ($CI_{90} \sim 0,3\%$) sont très proches de la concentration micellaire critique (CMC) de ce TA, soit 0,23% (7 mMol), concentration au-delà de laquelle se forme des micelles. Alors que pour le Tween 20[®], la CMC est inférieure d'environ un ordre de grandeur à la concentration inhibitrice minimale, soit respectivement, 0,007 % (0,06 mMol) et $CI_{10} \sim 0,01$ à 0,02% alors que la CI_{90} est supérieure à 1% de Tween 20[®]. Ainsi dès la formation de micelles, le SDS inhibe totalement l'adsorption tandis que le Tween 20[®] nécessiterait une plus forte concentration en micelles pour inhiber l'adsorption. Ce phénomène semble donc être en rapport avec les propriétés d'encapsulation des matières actives des TA. Le SDS posséderait une meilleure capacité que le Tween 20[®].

La capacité de réduction de l'adsorption est assurément importante pour limiter la rétention des molécules et pour cela le SDS semble plus efficace. En revanche, au cours du transfert des substances actives, la solution d'injection tend à être diluée par le courant de sève. Le Tween 20[®] pourrait s'avérer plus efficace, en maintenant plus longtemps un effet inhibiteur sur la rétention et donc en permettant un effet plus long dans le temps que le SDS. Cela pourrait expliquer que dans des essais préliminaires sur branches excisées, le Tween 20[®] ait permis une augmentation du transfert du difénoconazole vers les feuilles, tandis que le SDS n'améliorait pas ce transfert (résultats non montrés).

Ainsi, sur branches excisées, nous avons pu montrer l'effet positif du Tween 20[®] sur le transfert du difénoconazole. En revanche, avec le pyriméthanil, l'effet positif observé *in vitro*, n'est pas retrouvé sur branches excisées. Il y avait même une détérioration du transfert du pyriméthanil et l'imidaclopride en présence de Tween 20[®] (Figure 34). Les résultats présentés ici ne permettent pas d'expliquer ce phénomène. Nous n'avons pu alors tester l'effet du SDS sur le transfert du difénoconazole sur branches excisées, ce qui serait intéressant de tester.

D'autres propriétés des TA peuvent aussi agir pour favoriser plus ou moins l'encapsulation ou modifier les interactions de surface avec la paroi, notamment, la taille des micelles, l'équilibre entre leurs caractères hydrophiles et hydrophobes (HLB : hydrophilic-lipophilic balance). Le HLB du SDS est par exemple beaucoup plus élevé que celui du Tween 20[®], 40 et 15 respectivement. D'autres facteurs devraient être pris en

considération pour le transfert et l'adsorption tels que l'impact du TA sur la réduction de la tension de surface de l'eau. Ainsi, à leur CMC, la tension superficielle de l'eau, γ , est relativement voisine, autour de 40 nN/m à 25 °C. En revanche, l'abaissement de la tension superficielle de l'eau est plus important avec le Tween 20[®] qu'avec le SDS à concentration identique. Cela devrait modifier les propriétés de transfert des injectats dans les vaisseaux, sans oublier le caractère ionique (SDS) ou neutre (Tween 20[®]) des tensio-actifs. Tous ces paramètres ont probablement leur propre impact sur la modulation du transfert des substances actives, mais celui-ci va aussi dépendre des caractéristiques de ces dernières.

Dans nos échantillons, nous ne distinguons ni les différents tissus du bois, vaisseaux et parenchyme, ni les différents polymères. Nous avons donc une représentation moyenne de la capacité du bois à retenir les substances actives. La comparaison entre les différentes molécules, nous semble cependant valable, car effectuée sur un même bois, le pommier. Néanmoins, le taux de rétention d'une molécule dans les différentes essences d'arbre va dépendre du type de bois, de la densité de vaisseaux actifs dans ce bois et du diamètre des vaisseaux, donc *in fine* de la densité de surface des vaisseaux en contact avec la solution.

4. Etude de l'impact de la viscosité sur le flux de substances actives

Dans les vaisseaux xylémiens circule de la sève brute, sève peu concentrée, contrairement à la sève élaborée. Cette sève circule dans les plantes du sol vers la canopée sous l'action de l'évapotranspiration foliaire. La principale perte de charge qui s'oppose à ce flux est la différence de hauteur entre la canopée et le sol ou le système racinaire. La viscosité de la sève brute, composée essentiellement d'eau et d'éléments minéraux, proche de la viscosité de l'eau (viscosité proche de 1 mPa.s⁻¹ pour la sève brute) n'est pas un paramètre limitant de cette circulation. Si on injecte dans le bois des solutions relativement concentrées en produits organiques, celles-ci vont être largement plus visqueuses que la sève brute et les pertes de charge vont nécessairement augmenter. La viscosité peut donc être un paramètre important pour l'injection lié à la formulation des PPP.

Dans le projet Preamisse, une des particularités de la méthode est la volonté d'injecter de faibles volumes. Cela implique d'avoir des préparations fortement concentrées en substance active. De ce fait, et à cause de la nécessité d'utiliser des coformulants pour

obtenir des solutions concentrées homogènes et stables, ces solutions présentent une viscosité plus élevée que la viscosité de la sève brute. Il sera donc introduit dans les vaisseaux xylémiens une solution de viscosité très supérieure à la sève, augmentant les pertes de charge dans les vaisseaux concernés.

Pour déterminer l'impact de cette viscosité élevée sur le flux d'évapotranspiration, des essais en conditions contrôlées sur branches excisées de différentes essences d'arbre ont été réalisés. Des essais théoriques ont aussi été réalisés avec des capillaires calibrés de diamètres voisins de ceux des vaisseaux du bois de vigne et de pommiers. Ces deux systèmes ont été choisis car le diamètre des vaisseaux xylémiens de la vigne est 10 fois plus grand que ceux du pommier, respectivement 20-40 μm et 250-500 μm .

4.1 Matériels et méthodes

4.1.1 Protocole :

Des tronçons de branches de 10 cm et de 8 à 10 mm de diamètre de différentes espèces, pommier, vigne, châtaignier et pin, ont été utilisés dans cette expérimentation (Figure 42).

L'extrémité basale des branches a été plongée, sur 1 cm, dans les solutions à tester. L'extrémité apicale a été reliée à un tube d'un diamètre de 3 mm connecté à une pompe à vide permettant d'assurer, avec une dépression de -100 mbar, la circulation du liquide dans les branches.

Le débit, sous dépression constante, a été déterminé par la mesure de la vitesse de déplacement du liquide dans le tube de sortie. Cette mesure était effectuée après avoir stabilisé le débit par un rinçage avec la même solution visqueuse mais non colorée à l'éosine. Plusieurs mesures de débit ont été faites pour chaque valeur de viscosité, chaque tronçon de branche et sur plusieurs branches de chaque espèce. L'eau pure avec l'éosine à 0,1% servait de liquide contrôle. Les mesures ont été effectuées à la température constante de 23 °C.

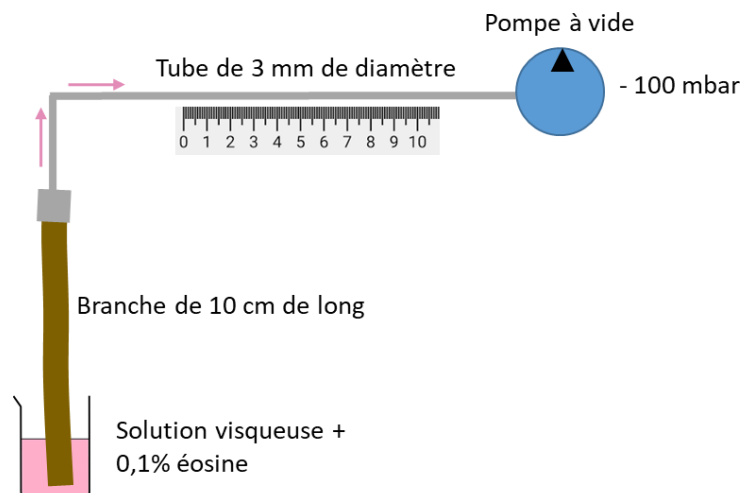


Figure 42 : Schéma du dispositif utilisé pour mesurer l'effet de la viscosité d'une solution sur le débit de sève sur des branches excisées de différentes essences d'arbre.

4.1.2 Solutions visqueuses

Des solutions de viscosité de 1 à 180 mPa.s⁻¹ ont été testées. Ces solutions ont été fournies par Belchim Crop Protection, un des partenaires du projet Preamisse. Elles correspondent à des dilutions aqueuses des bases de formulation utilisées pour les préparations des substances actives testées en verger pour les expérimentations de ce projet. Les solutions étaient préalablement colorées avec de l'éosine à 0,1% pour faciliter leur détection.

4.1.3 Calculs

La vitesse de circulation (en mm.min⁻¹) dans les différentes branches a été calculée en rapportant le débit déterminé dans le tube de mesure à la section efficace de chaque espèce. Cette section, en mm², a été mesurée par observation à la loupe binoculaire de la surface colorée par la solution d'éosine à 3 cm de l'extrémité basale, en fin d'expérimentation. C'est la surface de xylème dans lequel circule la sève.

4.2 Résultats et discussion

Dans un premier temps, la valeur nominale de la vitesse d'une solution aqueuse, représentative de la sève brute, a été mesurée pour chaque espèce à une tension d'aspiration de 100 mBar (pression stable minimale que nous pouvions obtenir dans nos conditions expérimentales). Chez la vigne et le châtaignier, ces vitesses sont environ 6 à 8 fois plus

élevées que chez le pommier ou le pin, soit respectivement 1744 (± 14), 1963 (± 141), 277 (± 19) et 206,1 ($\pm 9,7$) mm/min pour la vigne, le châtaignier, le pommier et le pin. Ces différences s'expliquent par les différences anatomiques du xylème entre ces espèces. En effet, le pin qui est un conifère possède un xylème non poreux constitué de trachéïdes de courtes longueurs et de faibles diamètres dans lesquelles l'eau circule de proche en proche à travers les ponctuations bordées, constituant ainsi un système avec d'importantes pertes de charge (Chaney, 1986). Le pommier est une espèce à zones poreuses diffuses avec des vaisseaux relativement courts de quelques dizaines de cm mais surtout d'un diamètre entre 25 et 50 μm . En revanche, le châtaignier, une espèce à bois poreux, et la vigne, une liane, possèdent des vaisseaux de diamètres plus larges, environ 300 μm (Ewers, 1985; Pallardy, 2008). Selon la loi de Poiseuille, les pertes de charge, ΔP , sont proportionnelles au débit volumique et à la résistance hydraulique, R_p , des vaisseaux, cette dernière étant inversement proportionnelle au rayon du capillaire à la puissance 4 et proportionnel à la longueur des vaisseaux (selon l'équation $R_p = 8 \eta L / \pi r^4$, où η , la viscosité dynamique ; L , la longueur et r , le rayon du capillaire). Ainsi, chez la vigne et le châtaignier, les pertes de charge dues au diamètre des vaisseaux sont beaucoup plus faibles que chez le pommier. A cela s'ajoute dans les faisceaux xylémiens le nombre de connections ou de ponctuations. Des pertes de charge importantes réduisent d'autant la vitesse de circulation pour une tension d'aspiration identique. En général, plus le xylème est poreux, plus les débits de sèves sont importants (Granier, 1977).

Un autre facteur important de la circulation des fluides dans un capillaire est la viscosité du liquide. Pour la sève brute, cette viscosité est proche de celle de l'eau et donc voisine de 1. Par contre, les solutions d'injection présentent une certaine viscosité à cause de la charge importante en matière. Or selon la loi d'hydraulique de Hagen-Poiseuille, le débit, et donc la vitesse de circulation d'un liquide, est inversement proportionnel à la viscosité du liquide ($v.s = \Delta P / 4\eta L$ où v , la vitesse et s , la section du capillaire). Nous avons donc testé l'impact de la viscosité sur la vitesse de circulation de la sève dans les différentes espèces. Les vitesses dans les branches en fonction de la viscosité des solutions sont présentées dans la Figure 43.

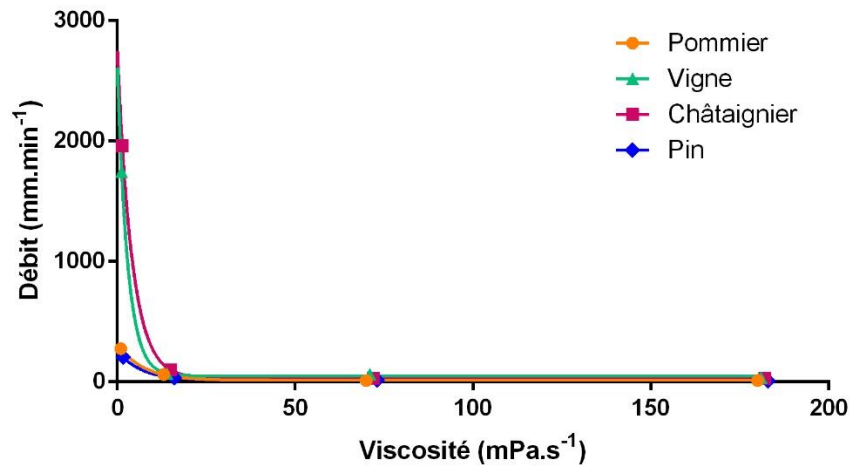


Figure 43 : Evolution de la vitesse de la sève dans les branches de différentes essences d'arbre en fonction de la viscosité de la solution.

Tableau 6 : Pourcentage de réduction de la vitesse de circulation de la sève dans les branches de différents arbres en fonction de la viscosité.

Viscosité (mPa.s ⁻¹)	Pommier	Vigne	Châtaignier	Pin
13	78,2	96	94,9	82,9
70	95,5	96,4	98,5	91,8
180	95,7	98	98,5	95,3

Malgré ces différences de départ, la vitesse de circulation chute drastiquement dans toutes les espèces dès la plus faible viscosité que nous avons testée, soit 13 mPa.s⁻¹. Cette diminution est d'autant plus marquée que la vitesse nominale de l'espèce était élevée, atteignant 96% de diminution du débit chez la vigne (Tableau 6). Lorsque la solution à 70 mPa.s⁻¹ est aspirée, le débit diminue encore mais beaucoup plus modérément et tend à se stabiliser avec la solution à 180 mPa.s⁻¹. L'augmentation de la viscosité augmente donc fortement le temps de transfert dans les vaisseaux, malgré une pression hydrostatique maintenue constante. Les solutions qui ont été injectées dans le cadre du projet Preamisse (voir chapitre 2) présentaient des viscosités comprises entre 50 et 65 mPa.s⁻¹. Elles n'ont toutefois pas pu être testées dans le cadre de nos expériences. Cependant, au regard de leur viscosité, leur injection devrait réduire fortement le flux de sève dans les vaisseaux dans lesquels l'injectât a été positionné, et donc provoquer un retard dans la distribution des substances actives par rapport au flux de sève dans lequel elles s'intègrent. De plus, il est

possible qu'à forte viscosité, il y ait une compensation de cette réduction du flux par une augmentation du flux de sève dans les vaisseaux voisins afin de compenser la demande en eau des feuilles alimentées par les faisceaux xylémiens impactés par l'injection. Nous n'avons pas de preuves de ce phénomène, mais il pourrait induire un retard encore plus important du flux de solution injectée.

Ici, nous n'avions pas la prétention de faire du génie hydraulique en tenant compte des différentes lois de dynamique des fluides (loi de Bernoulli, loi de Poiseuille, etc.), mais nous voulions essayer de quantifier l'impact de la viscosité de l'injectât sur la vitesse de distribution des matières actives vers le feuillage de différentes essences. D'autre part, il est à noter que, pour des raisons pratiques, la tension exercée dans nos expérimentations correspond à la tension exercée par une colonne d'eau d'un mètre, soit dix fois la longueur de notre segment d'une branche test. Les vitesses dans nos essais se trouvent ainsi être probablement très supérieures à celle de la sève en conditions réelles, d'autant plus que sur des segments aussi courts, excepté pour le pin, un certain nombre de connections inter-vaisseaux sont supprimées, réduisant ainsi les pertes de charges.

Toutefois, les pertes de charges sont proportionnelles à la vitesse, mais aussi à la longueur du segment étudié. Ainsi, nous pouvons considérer que les pertes de charges que nous engendrons avec la vitesse expérimentale, environ dix fois plus élevées dans le segment de 0,1 m, correspondent à celle engendrées dans un segment de 1 m pour une vitesse 10 fois plus faible. Or, nous avons estimé précédemment que, au regard de la section de bois impactée par l'injection, un injectât de 1 ml se répartissait sur environ 1 m de hauteur de tronc. Nous pouvons donc considérer que les effets observés ici sont cohérents avec les impacts sur le débit qui pourraient être observés *in vivo* après l'injection de 1 ml de solution visqueuse. Une viscosité élevée d'un injectât devrait ralentir la distribution des molécules ou même bloquer l'injectât sur son site d'injection.

5. Conclusions

L'injection de colorants a montré qu'au niveau du point d'injection, l'injectât diffuse très peu. Dans l'ensemble la solution injectée reste très localisée du fait de la sectorisation du système vasculaire des arbres. Cette sectorisation varie de plus d'une essence à l'autre. Toutefois, malgré la sectorisation, différentes trajectoires de transfert ont été observées,

d'un mouvement rectiligne à spiralé. La trajectoire de transfert influence donc la répartition dans l'arbre.

Nos résultats ont aussi montré d'autres facteurs majeurs affectant le transfert : la lipophilie des molécules et probablement le contenu en lignine de l'arbre, polymère responsable de l'adsorption des molécules dans le bois. En effet, des molécules très lipophiles comme le difénoconazole sont adsorbées sur les vaisseaux et ne sont donc pas transférées ou très faiblement. Toutefois, l'ajout de tensio-actifs limite nettement l'adsorption des molécules et améliore ainsi leur transfert. Il serait donc possible d'utiliser des molécules lipophiles à condition d'avoir fait un travail préalable pour adapter leur formulation à l'injection. Néanmoins, le transfert est un processus dynamique avec certainement une phase de dilution de l'injectât dans la sève brute, entraînant ainsi une diminution de l'efficacité des TA et de ce fait une augmentation de l'adsorption, plus en aval du point d'injection, des substances actives sur le xylème. En complément, un phénomène de désorption peut avoir lieu. Les substances actives seraient/sont ainsi emportées au fur et à mesure avec le courant de sève et donc transférées sur des temps beaucoup plus longs.

Enfin, nos résultats ont aussi montré que la viscosité des solutions, souvent élevée à cause de la concentration élevée en substance active et des coformulants, réduisait le débit de sève, entraînant un retard dans la livraison des molécules. Cela explique pourquoi même des molécules faiblement adsorbées comme l'imidaclopride ont un délai d'apparition dans le feuillage par rapport à la vitesse de circulation de la sève dans le xylème. En plus des phénomènes d'adsorption et malgré l'emploi de TA, c'est aussi le cas pour le difénoconazole. Dans le cas de l'imidaclopride, un second phénomène pourrait intervenir. En effet, en cours de dilution lente, une préparation d'imidaclopride concentrée, telle que le Confidor® (Bayer, France), passe par une phase de précipitation de l'imidaclopride. Des cristaux ainsi formés dans le xylème pourraient mettre du temps à se redissoudre, d'où le temps mis par l'imidaclopride pour atteindre le feuillage.

Néanmoins, une attention particulière doit être apportée à ne pas trop augmenter la viscosité des solutions avec les coformulants. En effet, nos résultats montrent que l'augmentation de la viscosité réduit de manière importante le débit de sève. Il faut donc en tenir compte pour ajuster le timing d'injection au temps de transfert pour faire coïncider le traitement avec les plages de protection souhaitées.

Pour conclure, la sectorisation du pommier explique l'hétérogénéité du traitement observé au champ même si le transfert spiralé permet une meilleure répartition des substances actives. Plus les molécules sont lipophiles plus elles sont adsorbées sur les vaisseaux. De ce fait leur transfert est plus faible et ralenti comme avec le difénoconazole. Néanmoins, un phénomène de désorption lent peut expliquer que le difénoconazole soit toujours retrouvé l'année suivante, malgré la chute des feuilles, mais ces concentrations restent toutefois très faibles. Nous avons vu dans les essais au champ que la reformulation du difénoconazole améliorerait que très légèrement le transfert de la molécule. En effet, les coformulants ont un impact sur le transfert sur les premiers cm après l'injection, mais ensuite la dilution de l'injectât fait perdre aux TA leurs propriétés (Figure 44). La viscosité des solutions injectées augmente aussi le temps de transfert des substances actives, nécessitant par la suite d'adapter la date d'injection au retard engendré.

Molécules liposolubles ●

Micelles ★
Tensio-actifs ★

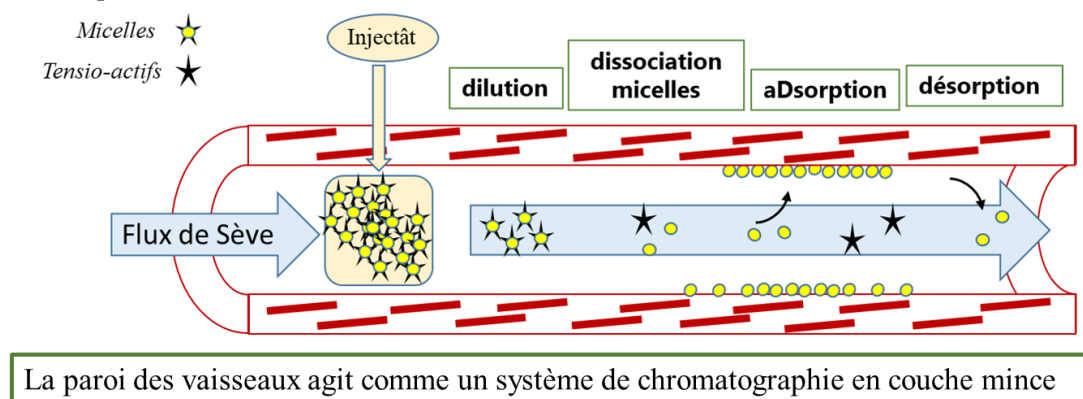


Figure 44 : Schéma du flux d'une substance active lipophile dans les vaisseaux xylémiens après injection d'une préparation micellaire de la substance active et processus de sorption de la substance active sur les parois après dissociation des micelles dans le flux de sève.

CHAPITRE 5 : ETUDE *IN VITRO* DE L'EFFICACITE DE DIFFERENTES SUBSTANCES ACTIVES ANTIFONGIQUES CONTRE DES CHAMPIGNONS PATHOGENES DES ARBRES

1. Introduction

Ce chapitre, axé sur l'efficacité in vitro de différentes substances actives (substances actives) antifongiques, est issu de travaux que j'ai réalisés en Italie. Il convient de mentionner que, dans le cadre de ma thèse, j'ai suivi le parcours EIR-A (Ecole Internationale de Recherche d'Agreenium). Ce parcours qui permet de donner une dimension internationale au doctorat nécessite de réaliser un séjour d'au moins trois mois dans un laboratoire étranger. Pour ce faire, la DARESE (INRA) m'a octroyé une bourse rendant possible ce séjour. J'ai donc été accueillie dans le département TESAF (Land, Environment, Agriculture and Forestry) de l'Université de Padoue (Italie) dans l'équipe du Professeur Lucio Montecchio.

Lorsqu'il a fallu choisir un laboratoire d'accueil, il nous a semblé intéressant de contacter le Pr. Montecchio, qui a développé la technologie BITE® (Blade for Infusion in TrEes ; P.A.N srl, Padova, Italy) pour l'injection dans les arbres. Cette technologie permet, comme dans notre projet, d'injecter les substances actives avec une aiguille lenticulaire, sans perçage préalable. En revanche, l'absorption du produit dans l'arbre se fait naturellement par effet venturi dû à la circulation de la sève xylémienne sous l'effet de l'évapotranspiration foliaire. Ce laboratoire travaille plus particulièrement sur l'efficacité de la méthode d'injection et sur la lutte contre les champignons pathogènes des arbres. Nous avons donc décidé ensemble d'étudier l'efficacité in vitro de différentes substances actives contre des champignons pathogènes de la vigne, du pommier, du pin et de l'olivier, en vue de leur utilisation par injection. Le temps était trop limité pour pouvoir ensuite réaliser des essais de ces substances en conditions de plein champ.

Pour développer la méthode de micro-injection, la dernière étape nécessite de trouver des produits efficaces en vue de leur application par injection et de déterminer les doses à injecter. Les produits phytosanitaires chimiques sont généralement efficaces à condition qu'ils possèdent les caractéristiques idéales, détaillées précédemment, pour leur transfert. Toutefois, étant donné que nous sommes actuellement dans un contexte de réduction de l'usage des produits chimiques, l'injection est aussi attendue pour délivrer des substances actives compatibles avec l'agriculture biologique. De plus, lorsque l'injection est utilisée en production fruitière, il pourrait exister un risque sanitaire de présence de résidus dans les fruits, comme dans le cas d'un traitement aérien. Ce risque pourrait être accru du fait d'une contamination systémique et s'étendre ainsi à la totalité des tissus fruitiers. Il est

donc d'autant plus intéressant dans ce cas de trouver des produits alternatifs aux produits chimiques classiques.

Dans cet essai, l'efficacité du thiabendazole, fongicide largement utilisé en arboriculture fruitière conventionnelle, ainsi que de deux produits alternatifs, les nanoparticules d'argent (nAg) et l'allicine, ont été testés contre différents champignons pathogènes.

Le thiabendazole est un fongicide systémique de la famille des benzimidazoles utilisé pour lutter contre les maladies à moisissures des fruits et légumes comme la rouille et prévenir les maladies de stockage en traitement de surface. Il a également un effet parasiticide. Dal Maso et al. (2014) ont mis en évidence l'efficacité du thiabendazole en injection contre la chalarose du frêne.

Récemment, des études ont clairement révélé l'activité antibactérienne à large spectre des nAg contre les bactéries Gram positif et Gram négatif, y compris les souches multi résistantes. Il faut souligner que les nAg exercent de multiples modes d'action inhibiteurs sur les microorganismes plutôt qu'une seule action spécifique des antibiotiques (Morones *et al.*, 2005; Panacek *et al.*, 2009). Plusieurs études ont montré l'activité antifongique des nAg sur des champignons phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea* ou *Alternaria alternata* (Kim *et al.*, 2009, 2012; Krishnaraj *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2014).

Parmi les alternatives à l'utilisation de produits chimiques de synthèse pour contrôler les bioagresseurs, certains extraits végétaux semblent être une solution prometteuse (Daferera, Ziogas and Polissiou, 2003; Abbaszadeh *et al.*, 2014). Les propriétés antimicrobiennes de l'allicine, extrait de l'ail, ont été montrées en médecine (Salehi *et al.*, 2019). Des études ont aussi mis en évidence l'efficacité de l'allicine pour lutter contre des champignons phytopathogènes (Curtis *et al.*, 2004; Rongai, Milano and Sciò, 2012). Dal Maso et al. (2014) ont aussi constaté une efficacité *in vitro* et *in planta* de l'allicine après injection contre la chalarose du frêne.

Six champignons ont été sélectionnés pour cette étude donc cinq font partie de la famille des *Botryosphaeriaceae* et *Botrytis cinerea*.

Les champignons de la famille des *Botryosphaeriaceae* sont des agents ubiquitaires, causant notamment le dépérissement de nombreuses plantes ligneuses (Moral *et al.*, 2010). Ils peuvent provoquer des symptômes variés en fonction de la culture et de l'espèce fongique. Ces divers symptômes se présentent sous forme de tâches foliaires, de

pourritures sur fruits, de mortalités de pousses et de bourgeons, de lésions vasculaires et de chancres sur rameaux et sur troncs. Ils sont signalés sur vigne dans de nombreux pays pour causer des dépérissements (Larignon *et al.*, 2009; Pitt *et al.*, 2012). Nous avons choisi pour cette étude trois des espèces de Botryosphaeriales plus fréquemment rencontrées sur vigne : *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* et *Diplodia mutila*. *Botryosphaeria dothidea* est aussi responsable de pertes économiques importantes sur pommier et olivier (Brown-Rytlewski and McManus, 2000). Pour l'olivier, nous avons également testé l'espèce *Diplodia olivarum*. Nous avons sélectionné une espèce largement répandue chez le pin, *Diplodia sapinea*, à l'origine du *Sphaeropsis* des pins (Ephytia, 2017).

La pourriture grise, causée par *Botrytis cinerea* peut réduire la production et affecter la qualité du raisin chez la vigne (Aziz, Heyraud and Lambert, 2004).

L'objectif de cette étude était donc de tester l'efficacité *in vitro* des nAg, de l'allicine et du thiabendazole contre les six champignons pathogènes des arbres sélectionnés. Le but final de ce séjour de recherche aurait été d'évaluer *in vivo* l'efficacité par injection des deux substances actives les plus efficaces contre le champignon pour lequel les meilleurs résultats ont été obtenus *in vitro*.

2. Matériels et méthodes

L'activité antifongique des substances actives a été déterminée *in vitro* selon le protocole présenté dans la Figure 45. Les « plugs » de colonie sont des disques de mycélium sur de la gélose fait à l'emporte-pièce.

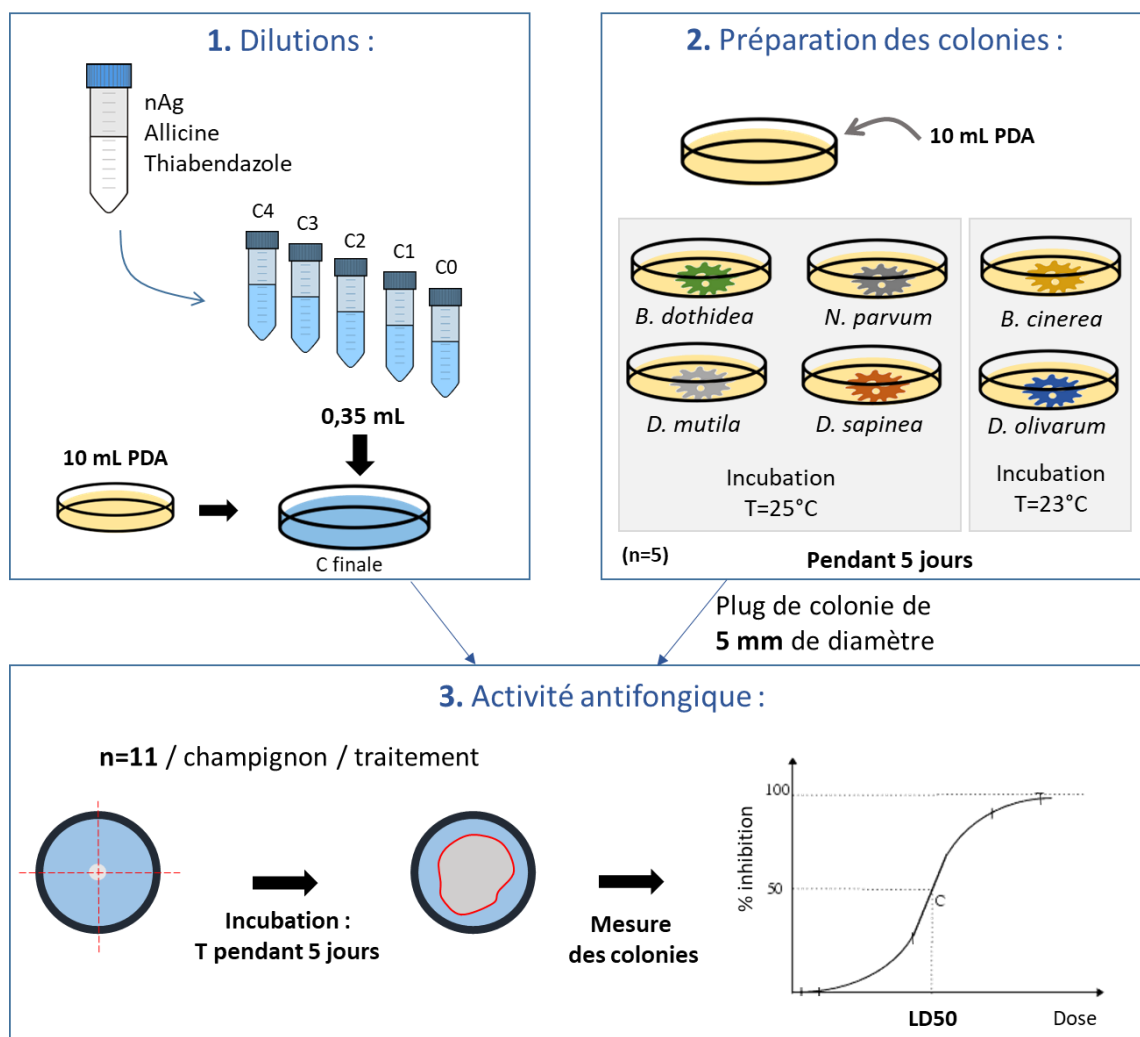


Figure 45 : Schéma expérimental utilisé pour déterminer l'activité antifongique des différentes substances actives

2.1 Substances actives

L'efficacité de trois substances actives, l'allicine (5000 mg/L), les nAg (4000 mg/L, Naturfree, Sassari, Italie) et le thiabendazole (Tecto 20S ; 220 g/L ; Syngenta Crop Protection, France) a été évaluée in vitro contre six souches de champignons. Cinq concentrations ont été testées pour chaque agent fongique (100 / 10 / 1 / 0,1 et 0 mg/L) dans des boîtes de pétri de 94 mm de diamètre contenant 10 mL de PDA (Potato Dextrose Agar, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Chaque substance active a d'abord été diluée dans de l'eau distillée stérile (Tableau 7) pour ensuite obtenir les concentrations finales par étalement de 0,35 mL de la solution sur chaque boîte de pétri (Dal Maso, Cocking and Montecchio, 2014). La concentration 0 est obtenue en appliquant uniquement de l'eau

distillée à la surface de la boîte de pétri et servira de référence. Onze répliquas de chaque traitement ont été réalisés.

Tableau 7 : Concentrations en substances actives : concentration dans la solution appliquée sur les boîtes de petri (0,35 mL/boîte) et concentration finale dans les 10 ml de PDA

	Concentration solution (mg/L)	Concentration finale (mg/L)
C0	0	0
C1	2,9	0,1
C2	28,6	1
C3	285,7	10
C4	2857,1	100

2.2 Matériel fongique

Botryosphaeria dothidea, *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia mutila*, *Diplodia olivarum* et *Diplodia sapinea* étaient originaires d'Italie, du laboratoire TESAF de l'Université de Padoue. La souche de *Botrytis cinerea* était originaire de France et a été fournie par le laboratoire Santé et Agroécologie de la vigne (INRA, Centre Bordeaux Nouvelle-Aquitaine). Les champignons étaient conservés dans des boîtes de pétri sur du milieu PDA dans l'obscurité à 23°C. Pour l'expérience, des plugs ont été prélevés dans la zone de croissance active des colonies et placés au centre de cinq boîtes de pétri contenant le milieu de culture non traité. Les nouvelles colonies ont été incubées à la température optimale de croissance de chaque espèce pendant 7 jours, c'est-à-dire 25°C pour *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia mutila* et *Diplodia sapinea* (Phillips *et al.*, 2012; Zlatkovic *et al.*, 2016). Pour *Diplodia olivarum* et *Botrytis cinerea*, les températures trouvées dans la littérature divergeaient selon les auteurs donc une température intermédiaire de 23°C a été fixée (Soylu, Kurt and Soylu, 2010; Olmo, Vegetal and Agr, 2016; Gonzalez-Dominguez *et al.*, 2017).

2.3 Tests d'efficacité in vitro

Après 7 jours d'incubation, des plugs de 5 mm de diamètre sont pris dans la zone de croissance active des colonies pour être placés individuellement au centre de chaque boîte de pétri contenant le traitement. Les boîtes de pétri contenant les plugs sont ensuite incubées aux températures de croissance des différentes espèces pendant 5 à 6 jours selon l'espèce, jusqu'à ce que les colonies dans les boîtes de pétri de référence aient atteint le bord de la boîte. Les boîtes de pétris sont ensuite scannées et la croissance mycélienne est estimée en mesurant la surface de la colonie avec le logiciel Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

2.4 Analyses statistiques

L'effet des substances actives sur la croissance mycélienne est estimée grâce au pourcentage d'inhibition. Ce pourcentage est calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{S_0 - S_c}{S_0} \times 100$$

S_0 = surface du mycélium dans le milieu de culture sans fongicide

S_c = surface du mycélium dans le milieu de culture additionné de fongicide.

Le dispositif expérimental a été analysé par ANOVA sur mesures répétées utilisant un modèle mixte. Comme les valeurs d'inhibition étaient exprimées en pourcentage, elles ont été transformées en arcsin pour obtenir une donnée continue. L'effet dose était le facteur répété, les facteurs fongicides et champignons étaient considérés comme facteurs fixes.

Deux types d'analyses ont été réalisées :

- 1- Pour chaque souche : ANOVA avec effet fongicide + dose + interaction
- 2- Pour chaque fongicide : ANOVA avec effet souche + dose + interaction

Nous avons utilisé les packages *lme4* et *lmerTest* qui sont des packages additionnels pour le langage et l'environnement R (<https://www.r-project.org/>) pour réaliser ces analyses.

L'analyse de la dose-réponse a été réalisée avec le package R *drc*. Le pourcentage d'inhibition en fonction de la dose et du champignon a été modélisé à l'aide du modèle log-logistic à 4 paramètres qui correspond à la fonction suivante :

$$f(x, (b, c, d, e)) = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$$

Le paramètre e correspond à la DL_{50} (Dose létale 50) qui est la dose produisant une inhibition de 50 % de la croissance.

b = pente à la DL_{50}

c = limite inférieure

d = limite supérieure

Les DL_{50} des différentes substances actives ont été comparées en utilisant l'hypothèse que les limites inférieures et supérieures étaient égales entre les différents champignons sélectionnés.

Les courbes de dose-réponse pour chaque champignon ont été obtenues avec le logiciel GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

Les DL_{50} ont été classées selon l'échelle d'Edington et al. (1971) :

- $DL_{50} < 1$ ppm, souche très sensible et fongicide très efficace
- $1 < DL_{50} < 10$ ppm souche modérément sensible et fongicide modérément efficace
- $10 < DL_{50} < 50$ ppm souche faiblement sensible et fongicide peu efficace
- $DL_{50} > 50$ ppm, souche insensible et fongicide inefficace.

3. Résultats

Cet essai a permis de mettre en évidence un effet des doses utilisées sur l'inhibition de la croissance mycélienne des champignons à un seuil de significativité $p < 0,001$. Quelle que soit la dose (0,1 ; 1 ; 10 ; 100 mg/L), les fongicides utilisés se distinguent statistiquement les uns des autres et ont une activité différente du traitement témoin (concentration 0). La meilleure efficacité est obtenue avec le thiabendazole. Les nAg ont montré une faible efficacité et l'allicine a montré des résultats intermédiaires mais plus variables. La réponse varie aussi d'un champignon à l'autre, surtout avec l'allicine.

L'analyse des variances (ANOVA) a montré que l'effet le plus important était dû à la substance active utilisée (F-value = 6090). L'effet-dose (F-value = 3279) et la nature du champignon (F-value = 140) n'intervenant respectivement que comme facteur secondaire et tertiaire.

Les DL₅₀ des différents produits testés pour chaque champignon sont données dans le Tableau 8 et les courbes de doses associées à chaque souche sont présentées dans la Figure 46.

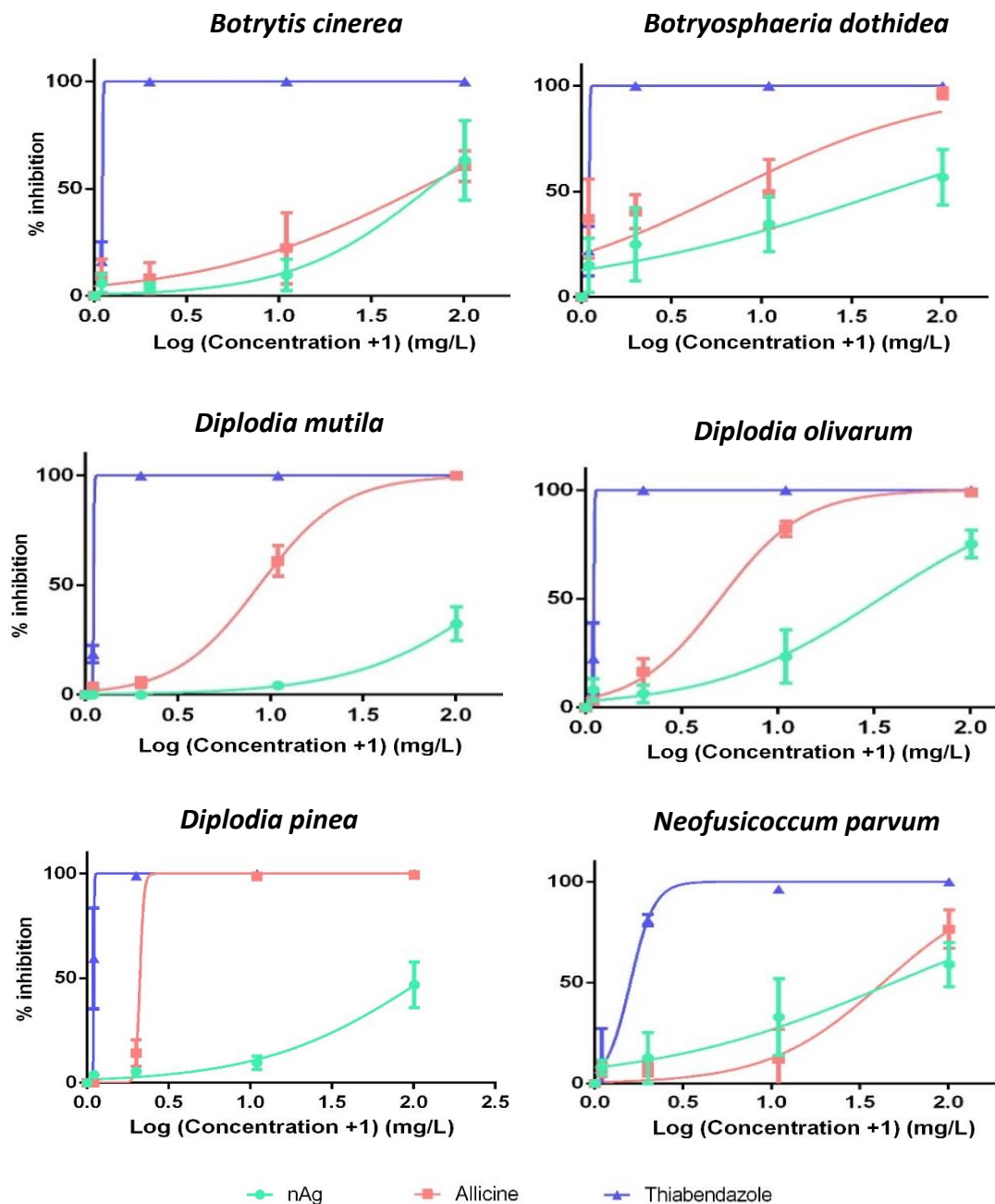


Figure 46 : Courbes de dose-réponse obtenues pour chaque champignon avec les trois substances actives.

Tableau 8 : DL₅₀ obtenues avec les nanoparticules d'argent, l'allicine et le thiabendazole contre les six champignons testés (mg/L)

	<i>nAg</i>	<i>Allicine</i>	<i>Thiabendazole</i>
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	61,39	2,15	0,14
<i>Botrytis cinerea</i>	72,57	59,35	0,17
<i>Diplodia mutila</i>	198,71	7,51	0,17
<i>Diplodia olivarum</i>	34,59	3,48	0,13
<i>Diplodia sapinea</i>	118,70	1,97	0,08
<i>Neofusicoccum parvum</i>	45,14	46,60	0,39

Avec le thiabendazole, aucune croissance fongique n'a été observée chez *D.mutila*, *D. olivarum*, *B. dothidea*, *D. sapinea* et *B. cinerea* dès la dose de 1 mg/L. Une inhibition totale de *N. parvum* n'est obtenue qu'à la dose de 100 mg/L. Toutefois, avec 10 mg/L le pourcentage d'inhibition de *N. parvum* est déjà de 96,3%. La DL₅₀ du thiabendazole est toujours inférieure à 0,40 mg/L. Selon l'échelle d'Edington, il est considéré comme très efficace et toutes les souches comme très sensibles. Pour tous les champignons, l'effet du thiabendazole est significativement différent des deux autres substances actives (Tableau 8).

L'allicine a totalement inhibé la croissance de *D. sapinea*, *D. mutila* et *D. olivarum* à la dose de 100 mg/L. A la dose de 10 mg/L, la croissance de *D. sapinea* est déjà inhibée à 98,7%. Pour les autres souches ou espèces, l'allicine n'atteint jamais une inhibition totale mais la croissance mycélienne de *B. dothidea* est cependant très faible avec 100 mg/L (inhibition de 96,5%). Les DL₅₀ calculées pour l'allicine sont beaucoup plus variables selon les champignons. Pour *D. sapinea*, *B. dothidea*, *D. mutila* et *D. olivarum*, celles-ci sont comprises entre 1 et 10 mg/L, les souches sont donc modérément sensibles et l'allicine considérée comme modérément efficace. Les DL₅₀ pour *B. cinerea* et *N. parvum* sont proches de 50 mg/L. Ces champignons sont donc considérés comme faiblement sensibles à insensibles face à cette substance active.

Dans aucun cas, les concentrations testées ne permettent aux nAg d'inhiber totalement la croissance des colonies. L'inhibition la plus élevée (75,3%) est obtenue à 100 mg/L pour *D. olivarum*. Excepté pour *N. parvum* et *D. olivarum* qui ont des DL₅₀ comprises entre 30 et 50 mg/L, pour les autres espèces, les DL₅₀ sont supérieures à 50 mg/L. Pour ces

dernières, les nAg ne sont donc pas efficaces. L'effet des nAg est significativement moindre que celui de l'allicine sur tous les champignons, excepté cependant sur *N. parvum* et *D. olivarum* (Tableau 9).

Les champignons qui ont été les plus sensibles aux substances actives testées étaient *B. dothidea* et *D. olivarum*. Les niveaux les plus faibles d'efficacité ont été observés avec *N. parvum* et *B. cinerea*.

Tableau 9 : Comparaison de l'efficacité des substances actives entre elles. p-values obtenues avec l'Anova.

	<i>B. dothidea</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>D. mutila</i>	<i>D. olivarum</i>	<i>D. sapinea</i>	<i>N. parvum</i>
Allicine – nAg	0,0282	0,1672	< 2,2e-16	< 2,2e-16	8,5E-16	0,8792
Allicine - Thiabendazole	0,0044	1,06E-11	< 2,2e-16	< 2,2e-16	2,1E-04	9,75E-13
nAg - Thiabendazole	0,0244	< 2,2e-16	< 2,2e-16	< 2,2e-16	4,4E-16	1,90E-06

4. Discussion

L'évaluation *in vitro* des substances actives testées a permis d'obtenir des résultats préliminaires sur leur efficacité contre les six champignons testés. Cette étude a montré que le thiabendazole, l'allicine et les nAg permettaient pour certains cas d'induire une diminution de la croissance mycélienne. Le thiabendazole a donné les meilleurs résultats avec les DL₅₀ les plus faibles et cette réponse était assez uniforme avec des valeurs comprises entre 0,14 et 0,39 mg/L. La sensibilité des champignons à l'allicine était plus variable et l'efficacité moindre. En effet les DL₅₀ allaient de 1,97 à 59,35 mg/L. Dal Maso et al. (2014) avaient aussi constaté une plus grande variabilité de l'efficacité de l'allicine par rapport au thiabendazole sur des souches d'*Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Dans leurs expériences et dans les mêmes conditions expérimentales, les DL₅₀ du thiabendazole étaient comprises entre 0,84 mg/L pour les souches les plus sensibles et 40,7 mg/L pour les moins sensibles. Les DL₅₀ les plus efficaces avec l'allicine étaient comprises entre 90 à 130 mg/L. Ces souches étaient donc moins sensibles que celles testées dans notre essai.

Les nAg ont montré l'efficacité la plus faible avec des DL₅₀ comprises entre 34,6 et 198,7 mg/L. Avec cette dernière substance active, l'inhibition totale de la croissance des colonies n'a jamais été atteinte aux concentrations testées. Derbalah et al. (2012) ont trouvé

une inhibition de la croissance mycélienne de *B. cinerea* de 77,9% à 100 mg/L de nAg, ce qui est cohérent avec notre étude. Khatami et al. (2017) ont montré une inhibition de 58% de la croissance mycélienne de *N. parvum* avec 10 mg/L de nAg, ce qui est une efficacité plus élevée que dans notre étude où nous n'avons mesuré que 30% d'inhibition.

Des différences ont été observées entre les différents agents antifongiques vis-à-vis des différentes espèces. Avec le thiabendazole, la plus faible DL₅₀ a été obtenue pour *Diplodia sapinea*, ce qui était aussi le cas avec l'allicine. En revanche, avec l'argent, la DL₅₀ pour *D. sapinea* était une des plus élevées (118 mg/L). Avec ce traitement, le meilleur résultat a été obtenu avec *Diplodia olivarum*. *D. olivarum* est un des champignons les plus sensibles pour les trois substances actives, il en est de même avec *B. dothidea*. La DL₅₀ la plus élevée pour nAg est obtenue avec *D. munita* alors que cette souche a une réaction intermédiaire avec l'allicine et le thiabendazole. *N. parvum* est celle pour laquelle le thiabendazole montre la DL₅₀ la plus élevée et l'allicine la deuxième plus élevée alors qu'avec l'argent, la DL₅₀ est une des plus faibles. Enfin, la souche la moins sensible à l'allicine était *B. cinerea* dont les DL₅₀ avec les deux autres substances actives étaient intermédiaires.

Compte tenu de la législation actuelle, du plan Ecophyto II et de la directive européenne 2009/128/EC qui vise à réduire l'utilisation des produits phytosanitaires, et de l'intérêt grandissant pour la lutte biologique contre les maladies fongiques, il est intéressant d'évaluer l'efficacité de biopesticides applicables par injection dans le tronc des arbres. Même si l'efficacité du thiabendazole est bien supérieure à celle de l'allicine, celle-ci présente tout de même un intérêt réel pour l'injection, surtout en production fruitière. En revanche, les nAg, à cause des résultats non probants aux concentrations testées, nécessiteraient d'injecter de trop grandes quantités pour obtenir une efficacité suffisante. De plus, les traitements par injection avec cette substance active seraient probablement trop coûteux, son intérêt reste par conséquent très limité.

Pour faire suite à cette étude, des essais *in planta* sont prévus. Ils n'ont pas pu être réalisés, faute de temps, pendant ce séjour de trois mois. Pour ces essais, l'allicine et le thiabendazole ont été sélectionnés, le thiabendazole servant de témoin positif. Un ou plusieurs des champignons les plus sensibles à ces deux molécules pourraient être testés, c'est-à-dire *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia munita*, *Diplodia olivarum* ou *Diplodia sapinea*. La première étape de cet essai consisterait en l'inoculation d'arbres et de vignes

asymptomatiques au printemps. Pour cela, l'écorce et le bois sont retirés sur environ 7 mm de diamètre et 5 mm de profondeur. Un plug de mycélium de même diamètre est prélevé en bordure de colonie et placé vers l'intérieur du trou, puis protégé avec l'écorce précédemment enlevée. Une fois les symptômes déclarés, l'allicine, le thiabendazole ou un témoin (eau ou formulations sans substance active) pourraient être injectés dans les arbres. Les dégâts pourraient ensuite être mesurés en écorçant les arbres pour mesurer la zone nécrosée et ainsi comparer les dimensions des dégâts entre le jour d'injection et quelques mois après. Pour vérifier la présence et la vitalité du champignon au cours de l'étude, des échantillons de bois pourraient être prélevés au bord de chaque point d'inoculation puis placés sur PDA afin d'identifier morphologiquement, ou par biologie moléculaire, les cultures fongiques. Les concentrations à injecter et le nombre de points d'injection seront estimés en fonction du transfert des molécules et du diamètre de l'arbre. Par exemple, Dal Maso et al. (2014), contre la chalarose du frêne, ont injecté 2 ml/cm dbh (diameter at breast height) de thiabendazole et d'allicine, soit respectivement 52,8 g/L et 4 g/L répartis en trois points d'injection. Trois mois après, ces injections n'ont pas stoppé la propagation du pathogène, mais comparé avec l'effet de l'eau, le thiabendazole a réduit la croissance des nécroses de 67,2% et l'allicine de 55,8%, démontrant ainsi une efficacité significative du traitement par injection.

Actuellement, les molécules employées par pulvérisation sont sélectionnées pour leur efficacité puis testées au champ pour définir une dose par hectare nécessaire et suffisante. Dans le cas de l'injection, il existe des molécules de référence, par exemple le thiabendazole dont on sait qu'il est efficace, mais pour lesquelles il est nécessaire de connaître non pas la dose à l'hectare, mais la concentration efficace. Celle-ci va permettre de déterminer une quantité à injecter par arbre pour espérer obtenir une dilution dans le feuillage efficace selon le développement de l'arbre. Ces tests *ex vivo* sont donc nécessaires pour choisir de nouvelles substances actives antifongiques mais surtout pour déterminer une concentration efficace à atteindre dans l'arbre.

CHAPITRE 6 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Lorsque cette thèse a commencé, la méthode d'injection dans le tronc des arbres était déjà pratiquée dans d'autres pays mais n'était pas autorisée en France, à l'exception d'une dérogation pour l'injection d'emamectine benzoate en lutte contre le charançon rouge du palmier (*Rhynchophorus ferrugineus*). Le palmier constitue cependant un cas très particulier car c'est une monocotylédone, il ne possède pas un tronc mais un stipe, botaniquement et anatomiquement très différent d'un tronc. Toutefois, cette méthode est largement répandue aux Etats-Unis et est utilisée dans certains pays d'Europe comme l'Italie ou l'Espagne. Les méthodes existantes sont principalement des méthodes qui peuvent être qualifiées de macro-injection, à cause du large trou réalisé avec une perceuse avant l'injection. Il est souvent reproché à ces méthodes de provoquer une blessure importante et de causer l'apparition d'un cal. Depuis ces dernières années, l'arrivée de nouvelles technologies/procédés d'injection avec des diamètres de perforation du tronc de plus en plus faibles et parfois même des méthodes d'injection sans pré-perçage avec une mèche a redonné un intérêt à la méthode.

Néanmoins, de manière générale, les résultats d'efficacité obtenus sont très variables, ne permettant pas toujours une efficacité suffisante pour contrôler les bioagresseurs. L'injection est aujourd'hui principalement utilisée sur des arbres ornementaux ou forestiers. En arboriculture ou en viticulture, des réticences à l'utilisation de cette méthode sont aussi dues à la méconnaissance du risque de transfert de résidus dans les fruits ou dans les fleurs. Dès le début du projet Preamisse, dont cette thèse fait partie, ce risque a été pris en compte. Ce projet avait pour ambition de développer, en France, une méthode de micro-injection sans perçage préalable. Elle devait permettre de délivrer les quantités suffisantes de produits de traitement des plantes (PPP) pour atteindre l'efficacité nécessaire tout en limitant la blessure causée à l'arbre et en supprimant par ailleurs les risques pour l'homme ou l'environnement. Dans ce contexte quatre objectifs de la thèse ont été définis.

- Le premier était d'évaluer l'impact de la méthode de micro-injection sur la santé de l'arbre en faisant des observations externes et internes en macroscopie et microscopie. Auparavant, les blessures d'injection avaient toujours fait l'objet d'observations à l'œil nu ;
- Le deuxième objectif était d'étudier la distribution des PPP dans les arbres après l'injection : répartition spatiale du traitement dans l'arbre, cinétique de distribution et de persistance du traitement en faisant des essais en conditions réelles ;

- Le troisième objectif était de déterminer les paramètres physiologiques et structuraux des arbres ou les caractéristiques des substances actives et de leurs formulations qui vont contrôler la mobilité des PPP dans les différentes essences d'arbres en menant des expérimentations en conditions contrôlées ;
- Enfin, un quatrième objectif s'est ajouté, offert par l'opportunité d'effectuer un séjour de recherche dans un laboratoire étranger, qui était de tester *in vitro* l'efficacité de substances actives antifongiques en vue de leur utilisation par injection.

La thèse a donc été structurée autour de ces quatre objectifs. Une synthèse des résultats et des conclusions va d'abord être présentée. Ensuite, les connaissances acquises par ces études et leurs implications dans l'avenir de cette méthode d'injection vont être discutées. Enfin, des perspectives de recherche pour améliorer les connaissances et cette technique vont être avancées.

1. Synthèse et conclusions

1.1 Impact de la méthode de micro-injection sur la santé de l'arbre

La méthode d'injection est souvent décriée du fait de la blessure qu'elle cause à l'arbre. Elle a pu être abandonnée dans certains cas pour avoir causé l'apparition de cals ne permettant pas une utilisation durable de cette technique, mais aussi à cause de l'importance de la blessure créant une porte d'entrée à l'invasion d'agents pathogènes. La plupart des méthodes d'injection existantes pratiquent, avant la mise en place de l'appareil d'injection proprement dit, un trou allant jusqu'à 10 mm de diamètre pour quelques centimètres de profondeur, prélevant ainsi une quantité de bois non négligeable. Dans ce projet, la méthode de micro-injection sans pré-perçage n'entraîne pas de perte de matière. Étudier la résilience des lésions tissulaires provoquées par ce type d'appareil était donc un prérequis à son utilisation pour montrer que celui-ci présentait une alternative crédible par rapport aux autres méthodologies. Dans cette partie, nous nous sommes demandés : **Quel est l'impact de la blessure d'injection ? Quelles sont les différentes réactions que l'arbre met en place en réponse à la blessure et dans quels délais ? Et enfin est-ce que la résilience de la blessure d'injection rend la méthode d'injection viable dans le temps ?**

Les essais d'injection effectués lors de cette étude n'ont pas eu d'impact négatif sur les arbres en général, dans le sens où il n'y a pas eu de pertes parmi les arbres injectés et où aucune invasion de pathogènes liée à l'injection n'a été détectée par la suite. Au niveau du point d'injection, il y a perforation de l'écorce (périderme et liber), du cambium vasculaire puis de l'aubier pour permettre de délivrer les produits sous une pression manuelle dans ce dernier. Nous avons démontré que les symptômes observés sont dus essentiellement à la perforation elle-même. L'injection d'eau ou de préparations phytopharmaceutiques ne cause qu'un accroissement minime de ces symptômes, malgré des concentrations souvent élevées de substances actives et uniquement au niveau de l'aubier par une légère extension de la zone compartimentée. Les résultats ont aussi mis en évidence les différents mécanismes développés par les tissus du pommier et de la vigne en réponse à la blessure d'injection. Le processus est globalement similaire chez les deux plantes malgré une structure tissulaire différente, néanmoins des différences apparaissent concernant le temps nécessaire au système vasculaire pour retrouver sa structure normale. Suite à la perforation, différentes barrières chimiques et physiques se développent, isolant les tissus internes de l'atmosphère extérieure. Chez le pommier, le trou est rapidement fermé et, dès la troisième saison de croissance, les nouveaux cernes formés (liber et bois) sont normalement constitués. La réponse de la vigne, bien que similaire, est plus lente à produire une cicatrisation efficace de la blessure. Les trous sont bouchés au bout de deux à trois saisons de croissance mais les derniers cernes formés n'ont pas encore totalement recouvert leur structure vasculaire normale dans l'axe de la perforation.

La méthode de micro-injection sans perçage permet donc d'avoir une blessure propre et peu invasive. Cette étude permet d'affirmer :

- que la méthode de micro-injection n'a pas d'impact négatif sur la santé générale de l'arbre et que l'incidence sur les tissus au point d'injection est suffisamment modérée pour permettre la reprise d'activité de tissus vasculaires après quelque temps ;
- que le faible volume tissulaire impacté n'entraîne pas, au moins pour ces deux essences, la formation de cals préjudiciables à son utilisation répétée.

Ces différentes barrières ont déjà été décrites et correspondent au modèle de CODIT de Shigo (...). Leur mise en évidence ici, le faible volume tissulaire impacté et la résilience assez rapide démontrent que cette méthode présente un faible impact sanitaire pour l'arbre et qu'elle pourrait, de ce fait, être utilisée durablement dans le traitement des mêmes arbres.

1.2 Distribution spatio-temporelle des produits phytosanitaires et durabilité du traitement

Le point essentiel pour la réussite d'un traitement par injection est, de manière évidente comme pour un traitement conventionnel par pulvérisation aérienne sur la frondaison, la régularité de la distribution spatiale du produit dans l'arbre. La difficulté ici est que le dépôt de la matière active est réalisé localement. D'autre part, le traitement doit être positionné dans le temps assez en amont du développement du parasite ou de la maladie à traiter pour permettre aux substances actives d'être distribuées dans le bon timing afin d'entrer en contact avec le bioagresseur, à la différence de la pulvérisation dont l'action peut être immédiate. Enfin, comme pour les autres traitements, la distribution doit être maîtrisée pour limiter le transfert de résidus dans les fleurs et dans les fruits afin de supprimer tout risque pour le consommateur et les insectes auxiliaires. Dans ce chapitre nous avons voulu répondre aux questions suivantes : **Comment les substances actives sont distribuées spatialement et temporellement en fonction de l'anatomie de l'arbre et des caractéristiques physico-chimiques des molécules ? Est-ce que des résidus sont retrouvés dans les fruits au moment de la récolte ?**

Des essais d'injections de molécules de différentes lipophilies, imidaclopride, pyriméthanil et difénoconazole, ont été réalisés dans des vergers de pommier. La cinétique de distribution de ces molécules dans le houppier a été déterminée dans les feuilles collectées dans différents secteurs de l'arbre. De plus, des fruits ont été récoltés à maturité.

Les analyses ont montré des concentrations plus élevées pour l'imidaclopride que pour les deux autres molécules. Le difénoconazole, la molécule la plus lipophile, était même très peu transférée dans le feuillage au regard de la quantité injectée. D'autre part, l'imidaclopride atteignait des concentrations élevées dans les feuilles plus rapidement que le pyriméthanil. Toutefois, une des principales observations de ces essais était la distribution très hétérogène des substances actives dans le feuillage et selon les arbres. La localisation du point d'injection semblait avoir un impact sur la répartition des substances actives, probablement en partie à cause de la conformation de chaque branche ou de la taille, mais cette variabilité rendait l'interprétation des résultats délicate.

Une information importante pour la pérennisation de cette méthode de traitement est qu'à la récolte, les résidus dans les fruits n'étaient soit pas détectés dans la plupart des cas, soit à des concentrations très au-dessous des LMR en vigueur sur ce fruit. C'était un point

crucial à considérer car, le fait de proposer un traitement par voies systémiques engendre de fortes réticences quant au risque de contamination des récoltes.

Afin de mieux analyser de devenir des substances actives après une injection ou de pouvoir comparer différentes préparations, nous proposons que les données de concentrations foliaires de cette méthode de traitement soient analysées selon une nouvelle méthode : l'analyse phyto-pharmacocinétique à l'aide d'un modèle mono-compartimental après absorption extra-foliaire des substances actives.

1.3 Facteurs contrôlant le transfert des substances actives dans les arbres

Les résultats obtenus au champ ont mis en évidence une grande variabilité dans la répartition spatiale des molécules et des différences temporelles de transfert, allant jusqu'à un défaut de transfert, tel que dans le cas du difénoconazole, la substance active la plus lipophile. Cela montre que l'injection entraîne une hétérogénéité de la couverture phytosanitaire de l'arbre qui devrait ainsi limiter son efficacité. Les paramètres liés aux substances actives ou à l'arbre qui pourraient avoir une influence sur le transfert et la distribution devaient donc être identifiés pour, dans un premier temps, expliquer ces observations, afin, dans un second temps, de les optimiser pour améliorer le transfert. Dans ce chapitre, nous nous sommes demandés : **Quelle est l'influence des caractéristiques des molécules et comment la structure de l'arbre influence-t-elle leur transfert ?**

Trois paramètres ont été plus particulièrement étudiés, l'impact du système vasculaire des arbres sur la distribution spatiale des molécules, l'influence des propriétés physico-chimiques des molécules et l'influence de leur formulation sur leur transfert.

L'emploi de colorants hydrosolubles a permis la visualisation précise des flux hydriques à partir d'un point d'injection chez différentes essences. En général, ce flux est très localisé, ce qui montre la forte sectorisation du système vasculaire des espèces étudiées limitant ainsi la répartition latérale des molécules. Cela montre aussi que, dans l'espace vertical, une branche peut intercepter l'ensemble du flux au détriment du reste de la frondaison. Toutefois, leur degré de sectorisation dépend de l'essence considérée et différentes trajectoires de transfert ont pu être observées, entraînant une distribution plus ou moins large dans le houppier. Deux autres facteurs interviennent : la position des feuilles sur le rameau, les feuilles positionnées en partie basse d'un rameau interceptant plus de s.a que les feuilles situées plus en aval ; et l'âge des feuilles en lien avec leur taux

d'évapotranspiration. De plus, les mouvements latéraux de l'eau hors des vaisseaux participent probablement à l'intégration de la distribution des substances actives, en augmentant leur diffusion latérale.

Nous avons montré un second facteur ayant une influence importante sur le transfert des substances actives, la lipophilie des molécules. Les plus lipophiles sont fortement retenues dans le système vasculaire par adsorption sur les parois des vaisseaux. La lipophilie est connue pour être le principal facteur contrôlant la mobilité des molécules organiques dans les plantes, conditionnant leur pénétration dans le végétal et leur systémie. Dans les arbres, la distance de parcours importante accroît d'autant plus la surface de rétention des molécules. Ainsi, le difénoconazole, très lipophile, est très peu et lentement transféré vers la frondaison à partir de l'injection dans le tronc des pommiers. L'ajout de tensio-actifs dans les formulations permet de réduire cette adsorption vasculaire et d'augmenter le taux de transfert vers les feuilles. Toutefois, au fur et à mesure du transfert cet effet semble atténué par dilution de l'injectât et donc du tensio-actif dans le courant de sève.

L'emploi de tensio-actif ou d'autres coformulants va cependant accroître certainement la viscosité de l'injectât. Nous avons montré que cela augmente, en parallèle, de manière parfois considérable les pertes de charge. La conséquence en est un ralentissement très fort du déplacement de l'injectât et donc un retard dans le transfert des molécules au-delà d'une viscosité de 13 mPa.s^{-1} . Or les préparations de PPP ont souvent des viscosités supérieures, d'autant plus que, dans la méthode de micro-injection telle que développée ici, un faible volume de préparation est délivré avec donc des concentrations en substance active élevées.

Ainsi la distribution spatiale dans l'arbre est régie par la sectorisation du système vasculaire de l'arbre et la trajectoire des faisceaux vasculaires, paramètres qui ne sont pas modifiables pour optimiser la distribution, mais dont il faut tenir compte pour adapter cette technique à chaque essence. Par contre, il est possible d'intervenir sur la lipophilie des molécules, ou tout au moins sur le choix de molécules le moins lipophile possible et sur des formulations adaptées pour maximiser leur transfert, en gardant en mémoire la nécessité de réduire au maximum la viscosité des solutions d'injection.

1.4 Efficacité *in vitro* de substances actives en vue de leur utilisation par injection

Comme pour l'ensemble des maladies ou des parasites à combattre, quelle que soit la méthode d'application, des substances actives adéquates doivent être sélectionnées et il est nécessaire de connaître les doses auxquelles elles sont efficaces. Etant donné que nous sommes actuellement dans un contexte de réduction de l'usage des produits phytosanitaires, il est intéressant de considérer des substances actives alternatives aux PPP conventionnels. Dans cette partie, réalisée en Italie, l'efficacité du thiabendazole, pris comme substance active témoin d'efficacité, de l'allicine et des nanoparticules d'argent ont été testées contre six champignons pathogènes. Nous nous sommes demandés : **A quelle dose ces produits sont-ils efficaces contre ces champignons tests ? Est-ce que ces produits alternatifs aux fongicides classiques peuvent être aussi efficaces ?**

L'allicine a montré une efficacité moindre que le thiabendazole, de deux ordres de grandeur, cependant une inhibition totale de la croissance mycélienne a été atteinte avec 100 ppm. Les nanoparticules d'argent présentaient, en revanche, une efficacité plus faible et n'ont pas permis une inhibition totale de la croissance mycélienne aux concentrations testées.

Le thiabendazole et l'allicine sont de bons candidats pour être utilisés en injection mais des preuves d'efficacité *in planta* sont nécessaires. Le temps imparti à mon séjour dans cette équipe de recherche ne m'a pas permis de passer au stade d'essais en grandeur nature, sur les arbres ou la vigne, mais ces essais sont envisagés dans le futur.

2. Limites et difficultés rencontrées

Pour obtenir les résultats de cette thèse, certaines difficultés ont été rencontrées. Le fait de travailler sur des arbres, des organismes vivants souvent imposants en était la principale. En effet, les essais au laboratoire sur des arbres sont souvent rendus impossibles de par leur taille. De ce fait, certains essais ont été réalisés sur des systèmes *ex vivo*, sur des rameaux excisés par exemple, qui ont donc une durée de vie limitée. De plus, le modèle d'étude pommier, du fait qu'il soit un arbre à feuilles caduques, impose des périodes d'étude restreintes pour les essais en vergers mais, aussi pour de nombreux essais en laboratoire, nécessitant la présence des feuilles pour assurer la circulation de la sève.

Pour les essais au champ, la difficulté principale était liée à la nécessité de trouver un arboriculteur (relativement proche du laboratoire) mettant à notre disposition un verger n'utilisant pas les mêmes traitements phytosanitaires que les molécules que nous avons sélectionnées. De plus, les essais ont montré une grande variabilité qui aurait requis un plus grand nombre de répétitions pour augmenter la puissance des analyses statistiques. Or il était difficile d'augmenter le nombre d'échantillons, d'une part, parce qu'il n'est pas possible d'augmenter indéfiniment le nombre d'analyses à cause de leur coût et du temps passé, d'autre part, parce que la récolte des arbres ainsi traités était perdue pour l'arboriculteur, limitant le nombre d'arbres à disposition.

Pour l'analyse des blessures d'injection, une des principales limites rencontrées a été le faible nombre de répétitions observables, car très coûteuses en temps, et les essences disponibles. En effet, du fait de la pérennité de ces cultures, il n'a pas toujours été facile de trouver des arbres à couper et en nombre suffisant. Ainsi, les blessures sur pin et sur châtaignier n'ont pu être faites. Il s'agissait déjà d'une belle opportunité de pouvoir « sacrifier » des pommiers et des vignes au seins de vergers actifs relativement peu de temps après une campagne d'injection.

3. Discussion générale

3.1 Impact de la méthode de micro-injection

La question de la viabilité de la méthode de micro-injection s'est posée du fait qu'il peut être nécessaire d'injecter tous les ans, voir même plusieurs fois par an les mêmes arbres. Pour cela, il est nécessaire que la blessure d'injection soit peu invasive et que le nouveau bois soit à nouveau fonctionnel, au moins rapidement les années suivantes. Pour les pommiers, la zone impactée ne représente en moyenne que 3,7 mm de large, à relativiser par rapport à la circonférence du tronc. Cette zone est suffisamment peu volumineuse pour que, même si elle doit être répétée, l'impact sur les flux soit négligeable. De plus, toujours chez le pommier, au bout de 3 saisons de croissance (incluant la saison d'injection), il n'y avait pratiquement plus d'impact de la blessure sur le système vasculaire utile. Il semble donc que cette méthode puisse être viable chez le pommier. Evidemment sur un tronc, le volume de bois impacté va dépendre du nombre de points d'injections répartis sur la circonférence en fonction du diamètre du tronc et du nombre de sessions

(traitement) d'injections par an. Toutefois, d'après nos essais et la littérature, il semblerait que le nombre de port d'injection idéal soit compris chez cette espèce entre 2 et 4, pour des arbres d'un diamètre autour de 10-15 cm (Aćimović *et al.*, 2014). Chez la vigne, la méthode devra être employée avec plus de précautions puisqu'il faut à cette espèce plus de temps pour arriver à une obturation efficace de la blessure et à la formation de nouveaux cernes fonctionnels. De plus, le diamètre des ceps de vigne est souvent très faible comparé aux arbres, ne permettant donc pas de faire un grand nombre d'injections chaque année. Ainsi les essais réalisés par ailleurs dans le projet PREAMISSE, ont montré la difficulté sur vigne de répéter les injections avec parfois l'apparition de fuites d'un point d'injection à l'autre et par les plaies de taille. Néanmoins, l'intérêt d'utiliser une méthode avec un faible diamètre de perforation sans perçage préalable est pertinent et mérite de continuer à être développée.

D'autres risques pour l'arbre liés à l'injection n'ont pas été abordés dans cette thèse. L'un d'eux est le risque d'embolie. Etant donné que des vaisseaux sont sectionnés, il pourrait y avoir rupture de la colonne d'eau entraînant un phénomène de cavitation préjudiciable à l'arbre (Cruiziat, Améglio and Cochard, 2001; Montecchio, 2012). Ce phénomène pourrait être accru par la viscosité des injectats qui augmentent les pertes de charge dans ces mêmes vaisseaux. Plus il y a de vaisseaux sectionnés, plus le phénomène sera important. Cela valide encore plus l'utilisation d'aiguille d'injection de faible diamètre. Des aiguilles lenticulaires introduites verticalement entre les fibres du bois, limitant la section des vaisseaux, peuvent aider à réduire la cavitation (Montecchio, 2012). Cependant, cette disposition semble accroître le fendillement de l'écorce, contrairement à une introduction perpendiculaire d'une aiguille lenticulaire. En outre, injecter aux heures où les flux de sèves sont réduits pourrait limiter le risque de rupture de la colonne d'eau.

Par ailleurs, l'injection dans le tronc, en plus de la possible phytotoxicité des solutions très concentrées en substances actives, peut perturber l'équilibre microbien des arbres. En effet, une faune endophyte est présente dans l'arbre et joue un rôle sur la santé de l'arbre (Porrás-alfaro and Bayman, 2011; Martin *et al.*, 2013). En injectant des substances actives, notamment des fongicides ou des antibiotiques, une partie de ces endophytes pourrait être affectée, modifiant ainsi l'équilibre physiologique des arbres. Ce point peut être particulièrement pertinent à surveiller dans le cas d'arbres ornementaux ou forestiers en place depuis longtemps et qui ne subissent que très rarement des traitements. En revanche, en arboriculture où les arbres sont souvent très contraints et « agressés » par la main de

l'homme, l'injection ne devrait pas avoir d'impact à ce niveau-là ou un impact plus modéré.

3.2 Vers une application de la méthode

3.2.1 Choix des substances actives et de leur formulation

De nos résultats émanent différentes recommandations pour l'application de la méthode d'injection. Déjà pour le choix des substances actives, nous avons vu qu'il faudrait préférentiellement s'orienter vers des molécules plus hydrophiles dont le K_{ow} ne dépasserait pas 3, pour limiter la rétention de la substance active dans le système vasculaire. Ensuite, si les molécules sélectionnées ont un log P élevé, nous avons montré que l'utilisation de tensio-actifs pouvait améliorer le transfert des molécules lipophiles, du moins tant que la concentration en tensio-actif reste suffisante dans le système vasculaire. Il faut cependant limiter la viscosité des formulations si l'on veut avoir une circulation aisée de l'injectât dans le courant de sève. Or dans le projet Preamisse, les préparations, même formulées spécifiquement pour la micro-injection atteignaient rapidement des viscosités relativement élevées au regard de la circulation de la sève. De manière générale, la formulation des substances actives est un levier important pour améliorer l'efficacité de l'injection et il est préférable d'utiliser des formulations spécifiques à l'injection, les formulations pour les autres types d'application ne semblant pas adaptées. Toutefois, de nombreux travaux sont sûrement encore nécessaires pour trouver une formulation idéale, si elle existe, qui dépendra probablement de la molécule, mais aussi du type de bois de l'essence à traiter.

3.2.2 Vers une réduction de l'usage des produits phytosanitaires

Une des attentes liées à l'injection dans le tronc des arbres était de réduire l'usage des produits phytosanitaires. Actuellement, il est difficile de dire si cet objectif peut être atteint par cette méthode puisqu'elle n'a pas encore été optimisée et qu'elle n'a pas toujours démontré son efficacité dans certains cas, notamment pour les traitements antifongiques. Néanmoins, une part de cette réduction souhaitée est obtenue grâce à la suppression de la dérive de pulvérisation puisque les produits sont délivrés directement à l'intérieur de l'arbre. Les doses par hectare peuvent alors être diminuées. Cet aspect bénéfique pour l'environnement de l'injection peut être contrebalancé par la nécessité de pallier le faible transfert de certaines substances actives. Toutefois, les doses d'essais ont été calculées en

se basant sur les doses/ha rapportées au nombre d'arbres par hectare et au nombre de points d'injection par arbre, n'allant donc pas dans le sens d'une réduction de la consommation de substances actives. Néanmoins, dans le cadre du projet, des essais d'injection d'abamectine contre la chenille processionnaire du pin ont donné des résultats en faveur d'une réduction des quantités de substances actives utilisées. Par rapport à un dose N appliquée par pulvérisation une fois par an, ces essais ont révélé à efficacité équivalente, la possibilité de au moins réduire par 6 (limite du temps du projet), la dose apportée, à savoir injection de demi dose, avec une efficacité équivalente à la méthode conventionnelle (env. 95% en moyenne), pendant trois ans sans renouvellement du traitement.

Deux autres points pouvant permettre une réduction de l'usage des produits phytosanitaires sont le nombre d'applications et la persistance du traitement. En effet, en arboriculture le nombre de traitements par an peut être très élevé. La durée d'efficacité des produits injectés, en court-circuitant les pertes par lessivage et par dégradation biotique ou abiotique en surface des feuilles, permettrait peut-être de réduire le nombre d'applications et donc la dose totale appliquée. Toutefois, il faut tenir compte du métabolisme de ces substances dans l'arbre qui réduira aussi leur durée de vie.

De plus, l'injection est aussi attendue pour permettre l'application de produits alternatifs aux pesticides. D'autres types de substances, telles que les extraits végétaux comme l'allicine que nous avons testés, ou les stimulants de défenses des plantes, comme le phosphonate de potassium utilisé dans le projet en vigne sur le mildiou, peuvent être efficaces et délivrés par cette méthode (Dal Maso, Cocking and Montecchio, 2014; Aćimović *et al.*, 2015; Hu, Jiang and Wang, 2018).

3.2.3 Adapter l'injection à l'arbre

Dans nos essais, les facteurs liés à l'essence d'arbre considérée, tels que l'anatomie du système vasculaire ou la structure des vaisseaux, ont montré avoir une influence sur le transfert. Ces facteurs ne peuvent pas être modifiés, néanmoins il faut en tenir compte pour adapter la méthode aux caractéristiques propres à chaque espèce. Pour contrer la sectorisation et obtenir un traitement homogène, le nombre de points d'injection peut être ajusté. Le nombre et le positionnement des points d'injection doivent être aussi réfléchis en fonction de la trajectoire des flux dans les arbres et de leur mode de conduite, le type de taille étant probablement un des facteurs les plus importants à considérer de ce point de vue. Optimiser le nombre de points d'injection permet d'améliorer l'homogénéité du

traitement et est important pour obtenir une bonne efficacité des substances actives injectées. De surcroît, c'est un point aussi particulièrement important pour éviter l'éventualité de développement de foyers de résistance à la substance active injectée. En effet, l'hétérogénéité de la répartition des molécules dans le feuillage, donnant des zones de plus faibles concentrations, insuffisantes d'un point de vue sanitaire, pourrait créer des foyers de résistance par pression de sélection.

3.2.4 Contre quels bioagresseurs utiliser l'injection ?

La méthode d'injection dans le xylème semble être applicable de manière à peu près évidente contre des maladies et parasites du feuillage. Toutefois, comme vue précédemment, l'hétérogénéité de la distribution des molécules pourrait compromettre le succès de la lutte par injection par la création de foyers de résistance. La mobilité du parasite peut être par contre un signe de réussite, celui-ci pouvant rencontrer au cours de ces déplacements sur l'arbre des zones avec une concentration suffisante pour l'atteindre de façon efficace. C'est probablement une des raisons du succès de la lutte par injection contre la processionnaire du pin tel qu'il a pu être démontré dans le projet PREAMISSE, même avec des molécules très lipophiles.

Par contre, cela semble plus problématique contre les maladies des fruits. Par exemple, la principale maladie cryptogamique des pommes est la tavelure qui se développe sur les feuilles et en surface du fruit. Une atteinte du champignon par voie systémique peut s'avérer plus difficile que par voie aérienne. Une partie de l'échec des tentatives qui ont été faites contre cette maladie est probablement à mettre sur le compte de cette difficulté lorsque l'inoculum primaire sur feuilles n'a pas été éradiqué. De plus, cette méthode devrait entraîner une contamination de l'ensemble du fruit et non pas seulement du péricarpe, d'où un risque plus élevé pour maîtriser les résidus à la récolte car la pulpe pourrait être alors autant contaminée que la peau du fruit. Ces deux exemples montrent que la gestion des traitements va dépendre du type de parasite ou de maladie.

Par ailleurs, beaucoup d'espoir est mis dans cette technique pour lutter contre les maladies du bois qui sont parmi les maladies dont nous avons actuellement le moins de solutions de traitement. Cette technique semble *a priori* intéressante contre ces pathogènes étant donné que l'on met le produit directement à l'intérieur du bois. De plus, la faible mobilité de certaines substances actives deviendrait un atout. Toutefois, d'une part cela entraîne la substance active vers la frondaison et surtout comme nous l'avons montré, le

système vasculaire est très sectorisé et le traitement ne diffuse pas latéralement vers les zones non injectées. De plus, certains pathogènes du bois contournent les zones traitées, évitant les secteurs où le produit est présent. Nos collègues du projet PREAMISSE ont montré ce phénomène lors d'essais de lutte avec cette méthode contre *Ceratocystis platani*, champignon responsable de la maladie du chancre coloré du platane (communication personnelle, Lauragri Service – CETEV).

Enfin, pour les pathogènes véhiculés par la sève élaborée, il est nécessaire que les substances actives soient transportées par le phloème plutôt que par le xylème. Or il est techniquement difficile de cibler le phloème par l'injection du fait de la faible épaisseur de ce tissu et du risque accru, dans ce cas, de décollement de l'écorce au niveau du cambium vasculaire. Il faudrait donc pour cela injecter des substances actives spécifiques de ce type de transport, comme cela peut être fait pour certains herbicides qui utilisent cette voie pour atteindre leur cible. De plus, le risque de résidus dans les fruits et dans les fleurs serait probablement aussi accru par l'injection de produits à systémie phloémienne. Il en serait de même pour des maladies atteignant les racines. Une systémie descendante, donc phloémienne, serait nécessaire pour les atteindre sous le point d'injection.

3.2.5 Choisir le bon moment pour injecter

Les injections peuvent être réalisées une ou plusieurs fois par an selon les périodes de présence du ravageur et la rémanence du produit. Des études ont montré qu'il ne serait pas nécessaire d'injecter tous les ans pour certaines problématiques grâce à une efficacité de ce type de traitement sur plusieurs années (Docola and Wild, 2012). Ce n'est probablement pas une réalité absolue. Dans nos essais, nous avons montré que le difénoconazole pouvait être détecté dans les feuilles l'année suivant le traitement, mais que les concentrations restaient très faibles. Ce qui indique néanmoins une certaine remobilisation du produit stocké dans le bois. En revanche, cela est confirmé dans la lutte contre la processionnaire du pin, mais dans ce cas, cela peut s'expliquer par le faible renouvellement des aiguilles au cours du temps (environ 1/5 à 1/4 par an). Ce phénomène doit donc dépendre de l'essence et de la substance active utilisée.

Le bon positionnement de la date d'injection reste toutefois essentiel pour la majorité des problématiques phytosanitaires. Il est en effet nécessaire de tenir compte du temps de transfert de la substance active dans l'arbre pour faire coïncider la concentration maximale de celle-ci dans le feuillage avec la période de présence du bioagresseur sur celui-ci. La

saison d'injection peut aussi avoir une influence puisque les flux ne sont pas les mêmes (Byrne *et al.*, 2014). Il faudrait donc connaître la période de présence des ravageurs, qui est propre à chacun d'entre eux, avec relativement de précision afin d'anticiper la période de traitement. A ce titre, il faudra se reposer sur de bons modèles de prédiction, ce qui n'est actuellement pas le cas pour toutes les problématiques. La méthode d'injection peut être utilisée en traitement préventif ou curatif, ce qui aura donc aussi une influence sur la date d'injection préconisée.

3.2.6 La méthode est-elle rentable ?

Malgré les avantages que pourrait présenter cette méthode de lutte, dans l'état des connaissances et avancées actuelles, il est encore difficile de savoir si la méthode de micro-injection peut être rentable pour l'arboriculteur ou le forestier puisque son coût va dépendre de la problématique à traiter. De toute manière, il faut considérer que s'il s'agit de traitement d'arbres ornementaux ou de verger, la densité de plantation et les enjeux économiques ne seront pas les mêmes. Nous avons toutefois réalisé un calcul estimatif pour le traitement d'un verger de pommiers.

Sachant qu'il est possible, avec le matériel utilisé ici au stade expérimental, d'injecter 80 arbres par heure et en considérant une densité de plantation de 2 500 arbres/ha, il faudrait 31,3 heures pour traiter 1 ha. En prenant un salarié au SMIC, le coût humain pour traiter cet ha serait à l'heure actuelle de 355 euros. A cela s'ajoutera le coût du matériel, négligeable comparé au pulvérisateur, et le coût de la substance active. A titre d'exemple, dans le cadre du projet, des résultats satisfaisants ont été obtenus contre le puceron vert du pommier avec le flonicamide (Teppeki®, Belchim Crop Protection, France) en une seule application avec 5% de la dose utilisée en pulvérisation, soit environ un coût de 2 €/ha.

Avec la pulvérisation, sachant qu'il faut environ 45 min pour traiter 1 ha à une vitesse moyenne de 6 km/h, le coût humain au SMIC serait de 8,5 euros. Le coût relatif au matériel (carburant, entretien) est en moyenne de 10 euros par ha. Bien sûr le coût d'amortissement d'un matériel, à l'achat est bien plus élevé. A cela s'ajoute le coût de la matière active. Dans l'exemple précédent de l'utilisation du Teppéki®, cela revient à 41,5 €/ha, soit un coût total à l'ha de 60 € par passage.

Le delta de coût à l'ha entre les deux méthodes serait donc d'environ 300 € en défaveur de la micro-injection, ce qui semble *a priori* prohibitif par rapport à un traitement classique.

Evidemment, la méthode d'injection n'en est qu'à ses PREAMISSES et elle peut probablement être optimisée, ne serait-ce qu'en augmentant le rendement d'injection.

Néanmoins, ce coût restera élevé. Il sera difficile de réduire drastiquement le temps passé par arbre mais la robotisation ou la mécanisation pourrait être une des solutions. En l'état actuel, l'injection serait surtout intéressante pour :

- des cultures à forte valeur ajoutée, dont le coût de traitement ne limiterait pas l'utilisation de la méthode ;
- des problématiques phytosanitaires nécessitant un grand nombre de passages avec un pulvérisateur, seulement si la micro-injection permet de réduire le nombre de traitements annuels ;
- le traitement des arbres ornementaux où la pulvérisation est à terme probablement condamnée par la réglementation ;
- des problématiques orphelines d'autres solutions techniques.

4. Perspectives générales

Les études réalisées ont permis d'acquérir des connaissances essentielles pour une bonne application de la méthode d'injection mais tous les aspects n'ont pas pu être abordés au cours de ces trois années, ce qui ouvre le champ à des perspectives de recherches complémentaires.

4.1 Tester différents facteurs qui influencent la réaction de l'arbre à la blessure

Une étude avait comparé les blessures de différentes méthodes d'injection par des observations externes (Aćimović *et al.*, 2016). Étant donné que les informations obtenues par ces observations externes sont très limitées et ne rendent pas compte de l'état réel de la cicatrisation de la blessure comme nous avons pu le montrer, il serait très intéressant d'appliquer notre méthode d'observation tissulaire pour comparer les blessures causées par les différentes technologies d'injection. En effet, il faudrait pouvoir comparer les blessures issues de méthodes avec et sans perçage ainsi que des technologies utilisant des pressions d'injection différentes, manuelles ou mécaniques, ou l'absorption naturelle. Dans nos études, nous avons toujours injecté 1 ml de solution. L'impact du volume d'injection pourrait aussi être évalué afin de savoir s'il existe un volume limite à ne pas dépasser. Cela pourrait peut-être permettre d'augmenter le volume injecté et donc de délivrer des doses plus importantes ou des préparations moins concentrées et moins visqueuses.

De plus, notre étude a mis en évidence quelques différences notables entre la vigne et le pommier dans leur réponse à la blessure. Ces différences sont certainement liées au type de bois et pourraient être généralisées par la suite aux différentes catégories de bois mais cette hypothèse reste à tester. Etant donné que le pommier est un arbre poreux diffus et que la vigne est une liane, il faudrait maintenant étudier les blessures d'injection sur le châtaignier qui est une espèce à porosité diffuse et le pin qui est un bois non poreux. Quelques images préliminaires ont été réalisées chez le châtaignier (Annexe 3) et montrent une réaction qui semble assez modérée et plutôt similaire à celle obtenue chez le pommier. La croissance du bois de plaie semble très rapide mais la résilience de la blessure n'a pu être étudiée. Ces observations sont à confirmer par de nouveaux essais sur plusieurs années.

4.2 Quantifier la rétention des molécules au point d'injection

Parmi les réactions aux blessures chez les arbres, il y a l'apparition de barrières dont la formation de thylles qui limite la dispersion verticale des pathogènes (Morris *et al.*, 2016). Cette observation soulève un point important : si les pathogènes sont bloqués au niveau de la blessure, qu'en est-il des substances actives injectées ? En effet, si la compartimentation bloque la propagation des agents pathogènes, il est possible qu'elle bloque aussi le transfert de la solution injectée. D'autant plus que cette réaction doit être rapide pour empêcher toute invasion. Il faudrait déterminer le temps nécessaire à la mise en place de cette barrière de thylles après l'injection. Des essais doivent être réalisés pour éclaircir ce point. Au cours de ma thèse, nous avons voulu déterminer ce point mais le nombre limité d'échantillons dans le temps ne nous a pas permis d'en donner une estimation. Il faudrait aussi quantifier le taux de substances actives bloquées au niveau du point d'injection. Un essai en spectroscopie infrarouge sur les sections de tronc a été réalisé mais nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants à cause du bruit de fond trop important engendré par le bois. Les composés polyphénoliques dont la lignine est constituée empêchaient de distinguer les molécules de substances actives, même à des concentrations injectées élevées. D'autres méthodes d'analyse doivent donc être testées pour localiser et quantifier les résidus dans le bois. Une autre possibilité, qui n'a pas été testée, serait d'injecter des solutions radioactives puis de réaliser des autoradiographies de coupes au niveau du point d'injection. La radioactivité piégée dans la zone d'injection pourrait ensuite être quantifiée. Néanmoins, cette méthode nécessiterait l'injection de

grandes quantités de radioactivité qui seraient probablement un peu trop coûteuses. Reste des méthodes plus classiques d'analyse mais pour lesquelles il est toujours difficile d'estimer le taux d'extraction exact pour valider ces méthodes.

4.3 Optimiser le transfert et évaluer la persistance du traitement

Les résultats des essais ont clairement montré que des molécules lipophiles telles que le difénoconazole n'étaient que peu transférées. Néanmoins, pour ce type de molécules, il faudrait peut-être faire des prélèvements à des temps plus longs que ceux réalisés ici. Cependant, si le relargage depuis les résidus adsorbés dans le bois est trop progressif, il se pourrait que les concentrations retrouvées dans les feuilles restent alors toujours très faibles. Cette hypothèse est donc à vérifier. Des études ont déjà été réalisées sur plusieurs années et des efficacités sur 2 à 3 ans ont été rapportées par Docola and Wild (2012) contre le puceron lanigère de la pruche et par Fidgen *et al.* (2013) contre le papillon *Choristoneura occidentalis*, parasite de l'épicéa. Néanmoins, dans les deux cas, comme pour le couple processionnaire-pin, ces traitements sont effectués sur des conifères à aiguilles persistantes dont le renouvellement est pluriannuel. Chez les espèces à feuillage caduc, il serait intéressant de déterminer si un relargage de certaines molécules peut avoir lieu en année n+1, après le renouvellement complet du feuillage. Toutefois, étant donné que les molécules trop lipophiles sont plus ou moins fortement adsorbées sur les vaisseaux du xylème, les recherches devraient s'orienter vers l'utilisation de molécules de plus faible lipophilie.

Les agents de formulation qui peuvent moduler les propriétés de transfert des substances actives ont aussi un réel intérêt et il y a encore peu de connaissances sur la formulation idéale pour l'injection. Nous avons mis en évidence l'utilité d'ajouter des tensio-actifs pour limiter la rétention des molécules et faciliter ce transfert. Lors de l'injection dans un arbre entier, le tensio-actif pourrait être efficace très localement, proche du point, mais son efficacité pourrait être rapidement réduite par dilution dans le courant de sève, surtout sur une longue distance de transport comme le suggère notre étude. Pour tester cette hypothèse en conditions réelles, il faudrait injecter des arbres avec des solutions de substances actives de différentes lipophilies avec ou sans tensio-actifs et peut-être tester des tensio-actifs de propriétés différentes (CMC diverses, composés ioniques ou neutres, par exemple).

L'ajout d'autres molécules telles que des micronutriments peut améliorer l'efficacité de l'injection comme l'a montré Dal Maso, Cocking and Montecchio (2017). Dans leurs essais, l'injection d'acide phosphoreux (H_3PO_3) combiné à des micronutriments minéraux a montré de meilleurs résultats curatifs que sans l'ajout de ces derniers et a significativement réduit le développement de *Phytophthora cinnamoni* par rapport à un contrôle dans le cas d'injections préventives. D'autres études ont montré l'intérêt de l'utilisation de micronutriments tels que le bore, le manganèse ou le zinc en protection des cultures (Reuveni, Agapov and Reuveni, 1997; Simoglou and Dordas, 2006; Dordas, 2008). L'apport de micronutriments aurait une influence sur les réponses de défense des plantes, compte tenu de leur implication dans la physiologie et la biochimie de la plante, ou directement, induire une résistance systémique acquise (Dordas, 2008). La combinaison de ceux-ci et d'une substance active dans un même traitement systémique pourrait accroître la synergie entre les deux. Il serait donc intéressant de continuer sur cette piste qui pourrait aller dans le sens d'une réduction des quantités de produits phytopharmaceutiques utilisés.

Une part de la durabilité d'un traitement est due à la dégradabilité de la substance active. Dans le végétale, cette dégradation est essentiellement métabolique. Il serait donc intéressant maintenant de déterminer le métabolisme des substances actives injectées, soit dans le bois par des mécanismes, par exemple, de copolymérisation avec la lignine, soit par métabolisation dans les feuilles (green liver concept). En effet, le métabolisme va affecter la persistance de l'efficacité du traitement. Ce point pourra être étudié ex-vivo sur des feuilles excisées en quantifiant le métabolisme sur une courte durée. Il serait aussi intéressant d'identifier les métabolites afin de savoir s'ils peuvent conserver une activité insecticide ou fongicide comme par exemple, l'oléfine, un des métabolites de l'imidaclopride (Sur and stork, 2003).

4.4 Evaluation du risque pour l'environnement

Nous avons étudié le risque de contamination des fruits mais il est tout aussi essentiel dans le contexte actuel, de le faire pour les fleurs étant donné le risque pour les pollinisateurs avec l'usage d'insecticide. Il faudrait injecter ces derniers à plusieurs temps avant la floraison puis collecter les fleurs et doser leur contenu en insecticide afin d'évaluer le risque d'exposition de la faune pollinisatrice. Un autre risque de contamination de l'environnement que nous n'avons pas abordé apparaît au moment de la chute des feuilles. Si des substances actives sont encore présentes dans le feuillage à cette période, elles vont

tomber au sol et risquent ainsi de contaminer les organismes vivants dans celui-ci, comme dans le cas d'une pulvérisation foliaire. Un prélèvement de feuilles à cette période, permettrait d'évaluer ce risque. Enfin, si des substances actives à systémie phloémienne venaient à être utilisées, il serait intéressant d'en évaluer le risque de contamination du sol par les exudations racinaires.

BIBLIOGRAPHIE

Abbaszadeh, S. *et al.* (2014) ‘Antifungal efficacy of thymol , carvacrol , eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi’, *Journal de Mycologie Medicale*. Elsevier Masson SAS, 24(2), pp. e21–e56. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.01.063.

Aćimović, S. G. *et al.* (2014) ‘Spatial and temporal distribution of trunk-injected imidacloprid in apple tree canopies’, *Pest Management Science*, 70(11), pp. 1751–1760. doi: 10.1002/ps.3747.

Aćimović, S. G. *et al.* (2015) ‘Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes’, *Frontiers in Plant Science*, 6, pp. 1–10. doi: 10.3389/fpls.2015.00016.

Aćimović, S. G. *et al.* (2016) ‘Comparison of drill- and needle-based tree injection technologies in healing of trunk injection ports on apple trees’, *Urban Forestry and Urban Greening*, 19, pp. 151–157. doi: 10.1016/j.ufug.2016.07.003.

Aitchison, E. W. *et al.* (1994) ‘Phytoremediation of 1 , 4-Dioxane by Hybrid Poplar Trees’, *Water Environment Research*, 72(3), pp. 313–321.

Allmen, E. I. Von, Sperry, J. S. and Bush, S. E. (2015) ‘Contrasting whole-tree water use , hydraulics , and growth in a co-dominant diffuse-porous vs . ring-porous species pair’, *Trees*. Springer Berlin Heidelberg, 29, pp. 717–728. doi: 10.1007/s00468-014-1149-0.

Aloni, R. and Peterson, C. A. (1991) ‘Seasonal changes in callose levels and fluorescein translocation in the phloem of vitis vinifera l.’, *IAWA Bulletin n.s.*, 12(3), pp. 223–234.

André, J.-P. (2002) *Organisation vasculaire des angiospermes : une vision nouvelle*. Edited by INRA.

Aubertot, J. M. *et al.* (2005) *Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l ’utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux*. France.

Aziz, A., Heyraud, A. and Lambert, B. (2004) ‘Oligogalacturonide signal transduction , induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*’, *Planta*, 218, pp. 767–774. doi: 10.1007/s00425-003-1153-x.

Berger, C. and Laurent, F. (2019) ‘Trunk injection of plant protection products to protect trees from pests and diseases’, *Crop Protection*, 124. doi: 10.1016/j.cropro.2019.05.025.

Biggs, A. (1985) ‘Suberized boundary zones and the chronology of wound response in tree bark’, *Phytopathology*, 75(11), pp. 1191–1195.

Biggs, A. R. (1986) ‘Phellogen Regeneration in Injured Peach Tree Bark’, (1984), pp. 463–470.

Bock, C. H. *et al.* (2013) ‘Trunk applications of phosphite for the control of foliar and

fruit scab on pecan', *Crop Protection*. Elsevier Ltd, 54, pp. 213–220. doi: 10.1016/j.cropro.2013.04.015.

Briggs, G. G., Bromilow, R. H. and Evans, A. A. (1982) 'Relationships Between Lipophilicity and Root Uptake and Translocation of Non-ionised Chemicals by Barley "', (April 1981), pp. 495–504.

Bromilow, R. H. and Chamberlain, K. (1988) 'Designing molecules for systemicity', in DR, A. R. and C. (ed.) *Mechanisms and regulation of transport processes*. British Plant Growth Regulator Group monograph 18, pp. 113–128.

Brown-Rytlewski, D. E. and McManus, P. S. (2000) 'Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria obtusa* on Apple and Management of Stem Cankers with Fungicides', *Plant Disease*, 84(9), pp. 1031–1037.

Brown, S. and Maloney, K. (2008) 'Scab-resistant Cultivars (Varieties)', *New york fruit quarterly*.

Bush, S. E. *et al.* (2010) 'Calibration of thermal dissipation sap fl ow probes for ring- and diffuse-porous trees', *Tree Physiology*, 30, pp. 1545–1554. doi: 10.1093/treephys/tpq096.

Byrne, F. J. *et al.* (2012) 'Evaluation of neonicotinoid, organophosphate and avermectin trunk injections for the management of avocado thrips in California avocado groves', *Pest Management Science*, 68(5), pp. 811–817. doi: 10.1002/ps.2337.

Byrne, F. J. *et al.* (2014) 'Seasonal timing of neonicotinoid and organophosphate trunk injections to optimize the management of avocado thrips in California avocado groves', *Crop Protection*. Elsevier Ltd, 57, pp. 20–26. doi: 10.1016/j.cropro.2013.11.023.

Calvet, R. *et al.* (2005) 'Retention des pesticides dans le sol', in *Les pesticides dans le sol : Conséquences agronomiques et environnementales*. France Agr, pp. 161–254.

Capri, E. *et al.* (2001) 'Imidacloprid and pyrimethanil soil sorption', *Agronomie*, 21, pp. 57–64.

Chaney, W.R. (1986) 'Anatomy and physiology related to chemical movement in trees', *Journal of Arboriculture*, 12(4), pp. 85–91.

Chatelut E. (2018) 'Pharmacocinétique : les fondamentaux. Collectif des Enseignants de Pharmacocinétique', Edited by Edimark, 408 p.

Chen, H.R., Rairat, T., Loh, S., Wu, Y., Vickroy, T.W., Chou, Chi, C. (2017) 'Assessment of veterinary drugs in plants using pharmacokinetic approaches: The absorption , distribution and elimination of tetracycline and sulfamethoxazole in ephemeral vegetables', *PLoS One*, 12, pp. 1–16.

Choat, B., Cobb, A. R. and Jansen, S. (2008) 'Structure and function of bordered pits : new discoveries and impacts on whole-plant hydraulic function', *New Physiologist*, 177, pp. 608–626. doi: doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02317.x www.newphytologist.org.

Cochard, H. and Granier, A. (1999) 'Fonctionnement hydraulique des arbres forestiers', *Rev. For. Fr.* *LI*, 2, pp. 121–134.

Coslor, C. C., Vandervoort, C. and Wise, J. C. (2019) 'Insecticide dose and seasonal timing of trunk injection in apples influence efficacy and residues in nectar and plant parts', *Pest Management Science*, 75, pp. 1453–1463. doi: 10.1002/ps.5268.

Cowles, R. S., Montgomery, M. E. and Cheah, C. A. S. J. (2006) 'Activity and residues of imidacloprid applied to soil and tree trunks to control hemlock woolly adelgid (Hemiptera: Adelgidae) in forests', *Journal of Economic Entomology*, 99(4), pp. 1258–1267. doi: 10.1093/jee/99.4.1258.

Cross, J. V *et al.* (2001) 'Spray deposits and losses in different sized apple trees from an axial fan orchard sprayer : 2 . Effect of spray quality', *Crop Protection*, 20, pp. 333–343.

Cruiziat, P., Améglio, T. and Cochard, H. (2001) 'La cavitation : un mécanisme perturbant la circulation de l ' eau chez les végétaux', *Mec. Ind.*, 2, pp. 289–298.

Curtis, H. *et al.* (2004) 'Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L .) against plant pathogenic bacteria , fungi and Oomycetes', *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65, pp. 79–89. doi: 10.1016/j.pmpp.2004.11.006.

Daferera, D. J., Ziogas, B. N. and Polissiou, M. G. (2003) 'The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea* , *Fusarium* sp . and *Clavibacter michiganensis* subsp . *michiganensis*', *Crop Protection*, 22, pp. 39–44.

Dal Maso, E., Cocking, J. and Montecchio, L. (2014) 'Efficacy tests on commercial fungicides against ash dieback in vitro and by trunk injection', *Urban Forestry and Urban Greening*. Elsevier GmbH., 13(4), pp. 697–703. doi: 10.1016/j.ufug.2014.07.005.

Dal Maso, E., Cocking, J. and Montecchio, L. (2017) 'An enhanced trunk injection formulation of potassium phosphite against chestnut ink disease', *Arboricultural Journal*. Taylor & Francis, 1375(July), pp. 1–17. doi: 10.1080/03071375.2017.1345538.

Delrot, S. and Bonnemain, J. L. (1991) 'Le transport à longue distance des herbicides dans la plante', in INRA (ed.) *Les herbicides : mode d'action et principes d'utilisation*, pp. 51–77.

Derbalah, A. S., Abd, G. and Elkot, E. (2012) 'Laboratory evaluation of botanical extracts , microbial culture filtrates and silver nanoparticles against *Botrytis cinerea*', *Ann Microbiol*, 62, pp. 1331–1337. doi: 10.1007/s13213-011-0388-1.

Dib, H. *et al.* (2010) 'The role of natural enemies on the population dynamics of the rosy apple aphid , *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera : Aphididae) in organic apple orchards in south-eastern France', *Biological Control*. Elsevier Inc., 55(2), pp. 97–109. doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.07.005.

Dilling, C. *et al.* (2010) 'Spatial and Temporal Distribution of Imidacloprid in Eastern

Hemlock in the Southern Appalachians', *Journal of Economic Entomology*, 103(2), pp. 368–373. doi: 10.1603/ec09237.

Dixon, H. H. and Joly, J. (1895) 'On the ascent of sap', *Philosophical Transaction of the Royal Society of London*, 186, pp. 563–576.

Doccola, J. J. *et al.* (2007) 'Efficacy and duration of trunk-injected imidacloprid in the management of Hemlock woolly adelgid (*Adelges tsugae*)', *Arboriculture and Urban Forestry*, 33(1), pp. 12–21.

Doccola, J. J. *et al.* (2011) 'Tree wound responses following systemic insecticide trunk injection treatments in green ash (*Fraxinus Pennsylvanica* Marsh.) as determined by destructive autopsy', *Arboriculture and Urban Forestry*, 37(1), pp. 6–12.

Doccola, Joseph J *et al.* (2012) 'Treatment Strategies Using Imidacloprid in Hemlock Woolly Adelgid (*Adelges tsugae* Annand) Infested Eastern Hemlock (*Tsuga canadensis* Carriere) Trees', 38(March), pp. 41–49.

Doccola, Joseph J. *et al.* (2012) 'Treatment strategies using imidacloprid in hemlock woolly adelgid (*Adelges tsugae* Annand) infested eastern hemlock (*Tsuga canadensis* Carrière) trees', *Arboriculture and Urban Forestry*, 38(2), pp. 41–49.

Doccola, J. J. and Wild, P. M. (2012) 'Tree Injection as an Alternative Method of Insecticide Application', in Soloneski, D. S. (ed.) *Insecticides - Basic and Other Applications*. InTech, pp. 61–78. doi: 10.5772/29560.

Dordas, C. (2008) 'Review article Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture . A review', *Agron. Sustain. Dev.*, 28, pp. 33–46.

Dreistadt, S. H. *et al.* (2016) *Pest of landscape trees and shrubs : an integrated pest management guide*. Edited by U. of California.

Dujesiefken, D. *et al.* (2005) 'Response of beech and oaks to wounds made at different times of the year', *European Journal of Forest Research*, 124(2), pp. 113–117. doi: 10.1007/s10342-005-0062-x.

Dujesiefken, D. and Rhaesa, A. (1999) 'Tree wound reactions of differently treated boreholes', *Journal of Arboriculture*, 25(3), pp. 113–123. Available at: <http://archive.treelink.org/joa/1999/may/01dujesiefken.pdf>.

Edington, L. V., Khew, K. L. and Barron, G. L. (1971) 'Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds', *Phytopathology*, 61, pp. 42–44.

Ellmore, G. S., Zanne, A. E. and Orians, C. M. (2018) 'Comparative sectoriality in temperate hardwoods : hydraulics and xylem anatomy', *Botanical Journal of the Linnean Society*, 150, pp. 61–71.

Ephytia (2017) *Diplodia sapinea*, syn. *Diplodia pinea*, *Sphaeropsis sapinea* : *Le Sphaeropsis des pins*. Available at: <http://ephytia.inra.fr/fr/C/19093/Forets-Sphaeropsis-des-pins> (Accessed: 11 September 2019).

- Ewers, F. W. (1985) 'Xylem structure and water conduction in conifer trees, dicot trees, and lianas', *IAWA Bulletin n.s.*, 6(4), pp. 309–317.
- Ewers, F. W. and Fisher, J. B. (1991) 'Why vines have narrow stems: Histological trends in Bauhinia (Fabaceae)', *Oecologia*, 88, pp. 233–237.
- Eyles, A., Davies, N. W. and Mohammed, C. (2003) 'Wound wood formation in Eucalyptus globulus and Eucalyptus nitens : anatomy and chemistry', 2339, pp. 2331–2339. doi: 10.1139/X03-149.
- Ferracini, C. and Alma, A. (2008) 'How to preserve horse chestnut trees from Cameraria ohridella in the urban environment', *Crop Protection*, 27(9), pp. 1251–1255. doi: 10.1016/j.cropro.2008.03.009.
- Fettig, C. J., Grosman, D. M. and Munson, A. S. (2013) 'Advances in Insecticide Tools and Tactics for Protecting Conifers from Bark Beetle Attack in the Western United States', in InTech (ed.) *Insecticides-Development of Safer and More Effective Technologies*. S. Trdan. Rijeka, Croatia, pp. 472–492. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- Fidgen, J. G. *et al.* (2013) 'Emamectin Benzoate Reduces Defoliation by', *Western Journal of Applied Forestry*, 28(4), pp. 170–173.
- Fosket, D. E. (1994) 'Introduction', in *Plant Growth and Development: A Molecular Approach*, pp. 1–40. doi: 10.1016/B978-0-12-262430-8.50005-X.
- Giles, C. H. *et al.* (1960) 'Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids', *Journal of the Chemical Society*, III, pp. 3973–3993.
- Gonzalez-Dominguez, E. *et al.* (2017) 'Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with diseased loquat (Eriobotrya japonica) in Spain', *Plant pathology*, 66, pp. 77–89. doi: 10.1111/ppa.12556.
- Granier, A. (1977) 'Transfert de sève brute dans le tronc des arbres aspects méthodologiques et physiologiques', *Ann. Sci. Forest.*, 34(1), pp. 17–45.
- Grosman, D. M. *et al.* (2010) 'Effectiveness of Two Systemic Insecticides for Protecting Western Conifers from Mortality Due to Bark Beetle Attack', *Western Journal of Applied Forestry*, 25(4), pp. 181–185.
- Hacke, U. G. and Sperry, J. S. (2001) 'Functional and ecological xylem anatomy', *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 4(2), pp. 97–115. doi: 10.1016/j.ppees.2005.02.001.
- Herrington, P. J., Mapothera, H. R. and Stringer, A. (1981) 'Spray Retention and Distribution on Apple Trees', *Pesticide science*, 12, pp. 515–520.
- Hopkins, W. G. (2003) *Physiologie végétale*. De Boeck U.

Hu, J., Jiang, J. and Wang, N. (2018) 'Control of Citrus Huanglongbing via Trunk Injection of Plant Defense Activators and Antibiotics', *Phytopathology*, 108, pp. 186–195. doi: 10.1094/PHYTO-05-17-0175-R.

Hu, J. and Wang, N. (2016) 'Evaluation of the Spatiotemporal Dynamics of Oxytetracycline and Its Control Effect Against Citrus Huanglongbing via Trunk Injection', *Disease Control and Pest Management*, 106(12), pp. 1495–1503.

Inoue, J., Chamberlain, K. and Bromilow, R. H. (1998) 'Physicochemical Factors Affecting the Uptake by Roots and Translocation to Shoots of Amine Bases in Barley', *Pesticide science*, 54, pp. 8–21.

Kenis, M. *et al.* (2019) *Guide to the classical biological control of insect pests in planted and natural forests*. FAO Forest. Edited by FAO. Rome.

Khatami, M. *et al.* (2017) 'Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Pine Pollen and Evaluation of the Antifungal Efficiency', *Iranian J Biotech.*, 15(2), pp. 95–101. doi: 10.15171/ijb.1436.

Kim, K. *et al.* (2009) 'Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*', *Biometals*, 22, pp. 235–242. doi: 10.1007/s10534-008-9159-2.

Kim, S. W. *et al.* (2012) 'Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi', *Mycobiology*, 40(1), pp. 53–58. doi: 10.5941/MYCO.2012.40.1.053.

Kozlowski, T. T., Hughes, J. F. and Leyton, L. (1967) 'Movement of injected dyes in gymnosperm stems in relation to tracheid alignment', *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 40(2), pp. 207–219.

Krishnaraj, C. *et al.* (2012) 'Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier B.V., 93, pp. 95–99. doi: 10.1016/j.saa.2012.03.002.

Kubler, H. (1991) 'Review article Function of spiral grain in trees', *Trees*, 5, pp. 125–135.

Labaune, J.P. (1987) 'Pharmacocinétique, principes fondamentaux', Edited by Masson, 616 p.

Larignon, P. *et al.* (2009) 'Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne', *C. R. Biologies*. Elsevier Masson SAS, 332, pp. 765–783. doi: 10.1016/j.crv.2009.05.005.

Lauri, P.-E. *et al.* (2011) 'Podosphaera leucotricha', *Innovations agronomiques*, 15, pp. 65–77.

Lucas, W. J. *et al.* (2013) 'The Plant Vascular System : Evolution , Development and Functions', 55(4), pp. 294–388. doi: 10.1111/jipb.12041.

- Mackay, A. A. and Gschwend, P. M. (2000) 'Sorption of Monoaromatic Hydrocarbons to Wood', *Environ. Sci. Technol.*, 34(5), pp. 839–845.
- Martin, J. A. *et al.* (2013) 'Resistance to Dutch Elm Disease Reduces Presence of Xylem Endophytic Fungi in Elms (*Ulmus* spp .)', *Plos One*, 8(2), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0056987.
- Mishra, S. *et al.* (2014) 'Biofabricated Silver Nanoparticles Act as a Strong Fungicide against *Bipolaris sorokiniana* Causing Spot Blotch Disease in Wheat', *Plos one*, 9(5), pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0097881.
- Montecchio, L. (2012) 'BITE: A low impact tool for trunk injections', *Journal of plant pathology*, 94(4).
- Moral, J. *et al.* (2010) 'Characterization and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Collected from Olive and Other Hosts in Spain and California', *Ecology and Epidemiology*, 100(12), pp. 1340–1351.
- Morones, J. R. *et al.* (2005) 'The bactericidal effect of silver nanoparticles', *Nanotechnology*, 16, pp. 2346–2353. doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059.
- Morris, H. *et al.* (2016) 'The Parenchyma of Secondary Xylem and Its Critical Role in Tree Defense against Fungal Decay in Relation to the CODIT Model', *Frontiers in Plant Science*, 7(November), pp. 1–18. doi: 10.3389/fpls.2016.01665.
- Mota-sanchez, D. *et al.* (2009) 'Distribution of trunk-injected 14 C-imidacloprid in ash trees and effects on emerald ash borer (*Coleoptera*: Buprestidae) adults', *Crop Protection*. Elsevier Ltd, 28(8), pp. 655–661. doi: 10.1016/j.cropro.2009.03.012.
- Neely, D. (1988) 'Tree wound closure', *Journal of arboriculture*, (October), pp. 148–152.
- Olmo, D., Vegetal, L. D. S. and Agr, S. D. M. (2016) 'Characterization and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Isolated from Almond Trees on the Island of Mallorca (Spain)', *Plant Disease*, pp. 2483–2491.
- Orians, C. M. *et al.* (2004) 'Differential sectoriality in long-distance transport in temperate tree species : evidence from dye flow , 15 N transport , and vessel element pitting', pp. 501–509. doi: 10.1007/s00468-004-0326-y.
- Orians, C. M., Smith, S. D. P. and Sack, L. (2005) 'How are leaves plumbed inside a branch ? Differences in leaf-to-leaf hydraulic sectoriality among six temperate tree species', 56(418), pp. 2267–2273. doi: 10.1093/jxb/eri233.
- Pallardy, S. G. (2008) *Physiology of woody plants*. Edited by A. Press.
- Panacek, A. *et al.* (2009) 'Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp.', *Biomaterials*, 30, pp. 6333–6340. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.065.
- Pergher, G. *et al.* (2013) 'Assessment of spray deposition and recycling rate in the vineyard from a new type of air-assisted tunnel sprayer', *Crop Protection*. Elsevier Ltd,

45, pp. 6–14. doi: 10.1016/j.cropro.2012.11.021.

Pergher, G. and Zucchiatti, N. (2018) ‘Influence of canopy development in the vineyard on spray deposition from a tunnel sprayer’, *Journal of Agricultural Engineering*, XLIX(801), pp. 164–173. doi: 10.4081/jae.2018.801.

Perry, T. O. *et al.* (1991) ‘Exploring alternatives to tree injection’, *Journal of Arboriculture*, 17(August), pp. 217–226.

Phillips, A. J. L. *et al.* (2012) ‘Resolving the Diplodia complex on apple and other Rosaceae hosts’, pp. 29–38.

Pitt, W. M. *et al.* (2012) ‘Evaluation of Fungicides for the Management of Botryosphaeria Canker of Grapevines’, *Plant Disease*, 96(9), pp. 1303–1308.

Ployet, R. (2017) *Regulation of wood formation in Eucalyptus during development and in response to environmental constraints*. Université Toulouse 3 Paul Sabatier. doi: 10.13140/RG.2.2.19496.67842.

Porras-alfaro, A. and Bayman, P. (2011) ‘Hidden Fungi , Emergent Properties : Endophytes and Microbiomes’, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 49, pp. 291–315. doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081831.

Reuveni, M., Agapov, V. and Reuveni, R. (1997) ‘A foliar spray of micronutrient solutions induces local and systemic protection against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginia*) in cucumber plants’, *European Journal of Plant Pathology*, 103, pp. 581–588.

Riederer, M. (2004) ‘Uptake and Transport of Xenobiotics’, in Press, C. (ed.) *Plant toxicology*, pp. 145–164. doi: 10.1201/9780203023884.ch3.

Rodriguez-Cruz, M. S. *et al.* (2008) ‘Effect of different wood pretreatments on the sorption - desorption of linuron and metalaxyl by woods’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 7339–7346.

Rodriguez-Cruz, S. *et al.* (2007) ‘Relationship between The Adsorption Capacity of Pesticides by Wood Residues and The Properties of Woods and Pesticides’, *Environ. Sci. Technol.*, 41(10), pp. 3613–3619.

Rongai, D., Milano, F. and Sciò, E. (2012) ‘Inhibitory Effect of Plant Extracts on Conidial Germination of the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*’, *American Journal of Plant Sciences*, 3, pp. 1693–1698.

Ruzicka, K. *et al.* (2015) ‘Xylem development – from the cradle to the grave’, *New Phytologist*, 207, pp. 519–535.

Salehi, B. *et al.* (2019) ‘Trends in Food Science & Technology Allicin and health : A comprehensive review’, *Trends in Food Science & Technology*, 86, pp. 502–516. doi: 10.1016/j.tifs.2019.03.003.

Schuetz, M., Smith, R. and Ellis, B. (2013) ‘Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms’, *Journal of Experimental Botany*, 64(1), pp. 11–31. doi:

10.1093/jxb/err313.

Shigo, A. L. (1984) 'Compartmentalization: A Conceptual Framework for Understanding How Trees Grow and Defend Themselves', *Annual Review of Phytopathology*, 22(1), pp. 189–214. doi: 10.1146/annurev.py.22.090184.001201.

Shigo, A. L., Money, W. E. and Dodds, D. I. (1977) 'Some Internal Effects of Mauguet Tree Injections', *J. Arboriculture*, 3(11), pp. 213–220.

Shigo, A. L., Shortle, W. and Garrett, P. (1977) 'Compartmentalization of discolored and decayed wood associated with injection-type wounds in hybrid poplar', *Journal of Arboriculture*, 3(6), pp. 114–118.

Simoglou, K. B. and Dordas, C. (2006) 'Effect of foliar applied boron , manganese and zinc on tan spot in winter durum wheat', *Crop Protection*, 25, pp. 657–663. doi: 10.1016/j.cropro.2005.09.007.

Simon, S. and Brun, L. (2011) 'Pesticide use in current and innovative apple orchard systems', 31, pp. 541–555. doi: 10.1007/s13593-011-0003-7.

Smith, K. T. (2015) 'Compartmentalization, resource allocation, and wood quality', *Current Forestry Reports*, 1(1), pp. 8–15. doi: 10.1007/s40725-014-0002-4.

Smith, K. T. and Lewis, P. A. (2005) 'Potential concerns for tree wound response from stem injection', in U.S.Department and of Agriculture, Forest Service, F. H. T. E. (eds) *Proceedings of the Third Hemlock Wooly Adelgid Conference*. Ashvill, NC, pp. 173–178.

Soylu, E. M., Kurt, Ş. and Soyly, S. (2010) 'International Journal of Food Microbiology In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*', *International Journal of Food Microbiology*, 143, pp. 183–189. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015.

Sperry, J. S. (2003) 'Evolution of water transport and xylem structure', *International journal of plant sciences*, 164, pp. S115–S127.

Spicer, R. and Groover, A. (2010) 'Evolution of development of vascularcambia and secondary growth', *New Physiologist*, 186, pp. 577–592.

Steudle, E. (1995) 'Trees under tension', *Nature*, 378, pp. 663–664.

Stroock, A. D. *et al.* (2013) 'The Physicochemical Hydrodynamics of Vascular Plants', *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 46, pp. 615–642. doi: 10.1146/annurev-fluid-010313-141411.

Sur, R. and Stork, A. (2003) 'Uptake , translocation and metabolism of imidacloprid in plants', *Bulletin of Insectology*, 56(1), pp. 35–40.

Takai, K., Suzuki, T. and Kawazu, K. (2003) 'Distribution and persistence of emamectin benzoate at efficacious concentrations in pine tissues after injection of a liquid formulation', *Pest Management Science*, 60, pp. 42–48. doi: 10.1002/ps.777.

Tanis, S. R. *et al.* (2012) 'Spatial and temporal distribution in Fraxinus trees', *Pest Management Science*, 68, pp. 529–536. doi: 10.1002/ps.2281.

Torelli, N., Krizaj, B. and Oven, P. (1994) 'Barrier zone (Codit) and wound-associated wood in beech (Fagus sylvatica L .)', *Holzforschung und Holzverwertung*, 46(3), pp. 49–51.

Trapp, S., Miglioranza, K. S. B. and Mosbaek, H. (2001) 'Sorption of Lipophilic Organic Compounds to Wood and Implications for Their Environmental Fate', *Environmental Science & Technology*, 35(8), pp. 1561–1566. doi: 10.1021/es000204f.

Tyree, M. T. and Zimmermann, M. H. (2002) *Xylem Structure and the Ascent of Sap*. doi: 10.1007/978-3-662-04931-0.

Vanwoerkom, A. H. (2014) 'Trunk injection : An alternative technique for pesticide delivery in apples', 65. doi: 10.1016/j.cropro.2014.05.017.

Vek, V., Oven, P. and Humar, M. (2013) 'Phenolic extractives of wound-associated wood of beech and their fungicidal effect', *International Biodeterioration and Biodegradation*, 77, pp. 91–97. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.10.013.

Venturas, M. D., Sperry, J. S. and Hacke, U. G. (2017) 'Plant xylem hydraulics : What we understand , current research , and future challenges', 59(6), pp. 356–389. doi: 10.1111/jipb.12534.

Vincent, C. and Panneton, B. (2019) 'Les méthodes de lutte physique comme alternatives aux pesticides', *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement*, 2(2), p. 9. doi: DOI : 10.4000/vertigo.4093.

Waisel, Y., Liphshitz, N. and Kuller, Z. (1972) 'Patterns of water movement in trees and shrubs', *Ecology*, 53(3), pp. 520–523.

Zanne, A. E., Sharma, M. and Orians, C. M. (2006) 'Patterns and consequences of differential vascular sectoriality in 18 temperate tree and shrub species', pp. 200–206. doi: 10.1111/j.1365-2435.2006.01101.x.

Zlatkovic, M. *et al.* (2016) 'Botryosphaeriaceae associated with the die-back of ornamental trees in the Western Balkans', *Antonie van Leeuwenhoek*, 109, pp. 543–564.

ANNEXES

Annexe 1 : Communication orale dans un congrès

48ème congrès du Groupe Français des Pesticides, 30 mai au 1er juin 2018, Limoges, France.

Transfert systémique des produits phytosanitaires dans les arbres après injection dans le tronc

Berger Cyndel (1), Renier Adeline (2), Mediouni Louisa (1), Laurent François (1)

(1) INRA UMR 1331 Toxalim, 180 chemin de Tournefeuille, 31300 Toulouse – cyndel.berger@inra.fr

(2) Cetev, La Pousaraque, 31460 Le Faget – arenier@cetev.fr

Prix de la meilleure présentation orale du 31 mai.

En arboriculture conventionnelle, la pulvérisation de produits phytosanitaires est la méthode la plus employée pour lutter contre les parasites et les maladies cryptogamiques. Cependant, une partie non négligeable du produit pulvérisé n'atteint pas la cible, le feuillage, à cause de retombées sur le sol, de dérive de pulvérisation, etc. Afin de réduire la contamination de l'environnement, des restrictions réglementaires sur les produits phytosanitaires ont été édictées, limitant l'utilisation de ces pratiques.

L'objectif de ces restrictions est de parvenir à une utilisation des produits phytosanitaires compatible avec la notion de développement durable et protéger les populations environnantes. Cela signifie que des solutions alternatives à la pulvérisation doivent être développées. Pour cela, l'injection de substances actives dans le tronc des arbres semble être une méthode prometteuse. Cette injection doit permettre de délivrer la quantité nécessaire et suffisante de substance active. Le concept est de délivrer les produits directement dans le système vasculaire xylémien pour éviter la barrière cuticulaire, le flux xylémien assurant la dispersion de la molécule dans l'arbre. Cela devrait être une méthode respectueuse de l'environnement pour contrôler de nombreux parasites, bactéries, champignons, nématodes et insectes.

Dans ce contexte, le projet PREAMISSE* a pour but de développer une méthode permettant l'injection de faibles volumes de solutions concentrées de substances actives, assurant un traitement efficace tout en limitant les dommages sur les arbres traités et les possibles impacts non-intentionnels sur l'homme et l'environnement.

Au sein de ce projet collaboratif, l'objectif de notre travail est de comprendre comment les produits phytosanitaires sont distribués dans différentes essences (pommier, vigne, pin et châtaigner) et de déterminer, au sein du modèle pommier, les paramètres physico-chimiques, physiologiques, ou anatomiques qui contrôlent leur transfert. Pour cela, 4 axes de travail sont explorés :

(i) l'étude de la répartition des molécules dans l'arbre à partir d'une injection très localisée de colorant ou produits phytosanitaires radio-marqués en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques et de l'anatomie des différentes essences

(ii) L'évaluation de l'impact de l'injection de solutions très concentrées sur le flux de sève xylémien en fonction de la structure des systèmes vasculaires

(iii), L'évaluation de l'impact de la perforation de l'aubier nécessaire à l'injection sur la santé de l'arbre, durant les années suivantes (1 à 3 ans) par la réalisation de coupes tissulaires au niveau de la perforation et une analyse par diverses méthodes microscopiques (stéréomicroscopie de fluorescence) permettant de mesurer la résilience de la blessure.

(iv) La réalisation de dosage des résidus dans les feuilles, par HPLC/MS-MS et par radio-HPLC, permettant de suivre la distribution au niveau de la cible.

Les premiers résultats de cette étude montrent une distribution hétérogène des composés dans les arbres en fonction des espèces. De manière générale, les concentrations des molécules sont plus élevées en partie basse des arbres qu'en haut. L'injection de faible volume limite la dispersion latérale de l'injectât. De plus, les flux xylémiens sont très sectorisés et la première branche située sur le faisceau xylémien injecté intercepte pratiquement la totalité de l'injectât, limitant ainsi cette dispersion. D'autre part, les molécules plus lipophiles ont tendance à s'adsorber sur les vaisseaux du xylème, réduisant leur déplacement. L'observation des blessures d'injection montre, dans la plupart des cas, une cicatrisation rapide. Une assise subéro-ligneuse se met en place pour isoler la blessure du milieu extérieur et le cambium retrouve sa fonctionnalité après un an, avec le développement de nouveaux tissus phloémiens et xylémiens.

Mots-clés : Injection, produits phytosanitaires, pommier, flux xylémiens.

* : PREAMISSE : Protection des arbres par micro-injection sécurisée (18eme AAP FUI)

Partenaires : Lauragri Services (porteur), INRA (Toxalim, équipe Métabolisme des Xénobiotiques), CETEV (Centre d'Expertise en Techniques Environnementales et Végétales), CTIFL (Centre Technique interprofessionnel des Fruits et Légumes), IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin), JADE, PREMETEC.

Annexe 2 : Communications affichées dans des congrès

Poster 1 :

10es Journée des doctorants SPE, 27 au 29 juin 2018, Nice, France.

Systemic transfer of Plant Protection Products in trees after trunk-injection

C. Berger¹, A. Renier², L. Mediouni¹, F. Laurent¹

¹*Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France*

²*Cetev, La Pousaraque, Le Faget, France*
cyndel.berger@inra.fr

3^{ème} prix du meilleur poster

Aerial spraying of plant protection products (PPP) is the most common application for pest management in trees. However, sprayers have drawbacks due to extensive pesticides drift losses and are impracticable for large tree sizes and in proximity of urban areas. Due to risks of environmental contamination and adverse impacts for applicators, legislative restrictions are applied in Europe to eliminate or restrict the use of this technique, particularly in urban area or non-agricultural zone. This means that alternative approaches have to be considered and Tree Trunk Injection (TTI) seems to be a promising technology. The concept of TTI is to deliver agrochemicals directly in the vascular system to avoid root or cuticular barrier and disperse PPP in plant. In this context, the Preamisse project aims to ensure an efficient micro-injection of concentrated solution of agrochemical while limiting damages on treated trees. In this project, my thesis objective is to understand the PPP distribution in four tree species (pine, apple, chestnut and vine) and determine the parameters controlling their transfer within the tree. I used dyes or radio-labelled PPP to study the transfer of compounds according to their physico-chemical properties and tree anatomy characteristics. I also evaluated impacts of the injection of concentrated solutions on xylem sieve fluxes according to the structure of vascular tissues. The first results show an heterogeneous distribution in trees depending on species and a reduction of sieve fluxes due to higher viscosity of injection solution. Observation of the wound closure in apple trees shows a successful healing in most of the cases.

Transfer of Plant Protection Products in trees after trunk-injection



C. Berger^{1*}, A. Renier², L. Mediouni¹, F. Laurent¹

¹ Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

² Cetev, La Pousaraque, Le Faget, France.

* cyndel.berger@inra.fr



Introduction

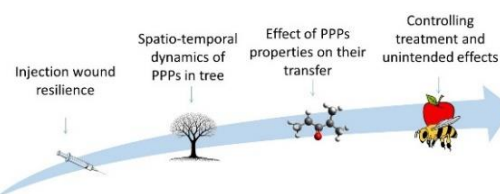
Context

- Currently pest management in orchards and forest is performed by aerial spraying of PPPs
- Pesticide use reduction context
- Trunk injection as an alternative to spraying [1]: Injection within sapwood (xylem) using a syringe



- More environmentally friendly method
- Fewer applications expected [2]
- Wound caused by injection
- Lack of knowledge about the distribution of the PPPs
- Unintended effects

Objectives



Methods

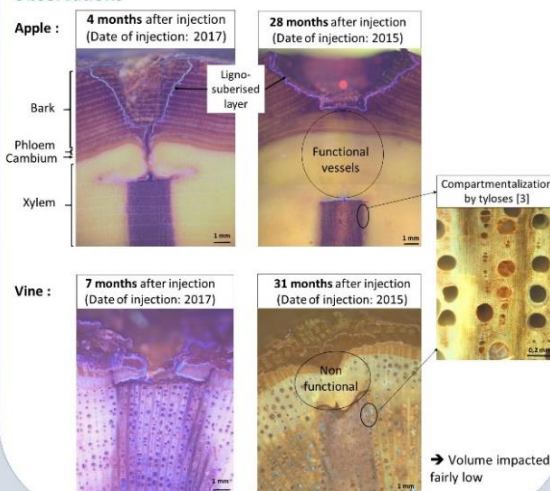
Injection wound resilience

Wound closure and Impact on tree health

	Apple trees		Vines	
Date of injections	2015	2017	2015	2017
	8 trees	9 trees	3 plants	2 plants
Cutting	November 2017		February 2018	

Observation of cross section by Fluorescence stereo zoom microscope

Observations



Results

Spatio-temporal dynamics

Transfer kinetics in apple trees

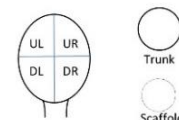
Tree comparison

Gobelet pruning with 3 scaffold branches



- D : Difenoconazole : 16 mg/mL
- I : Imidacloprid : 20 mg/mL
- P : Pyrimethanil : 10 mg/mL

Injections under or between 2 scaffolds

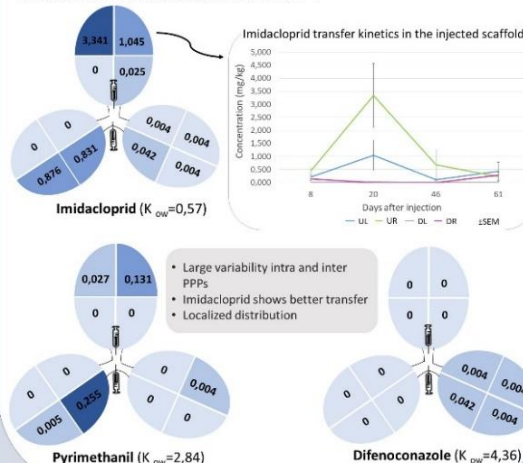


- Leaf sampling: dates 7, 20, 40 and 60 days after injection
- Bottom / Top localisation, 4 zones: Up(U) or down(D), left(L) or right(R)

Analyses by LC-MS/MS

Data of the 20th day sampling

Average concentrations (mg/kg) for each zone, n= 3



Conclusions and Perspectives

- Minimal impact of the needle injection method on the tree but better wound healing in apple
- Complex spatio-temporal dynamics: high variability and heterogeneous distribution

Need to gain knowledge about the impact on the transfer of the :

- Retention of molecules on the vessels
- Compartmentalization by the tyloses
- Leaf transpiration
- Formulation's viscosity of the PPPs

Conclusions

References

- [1] Doccia, J. J., & Wild, P. M. (2012). In *Insecticides-basic and other applications*. InTech.
- [2] Ćimović, S. G., et al. (2014). Pest management science, 70(11), 1751-1760.
- [3] Shigo, A. L., & Marx, H. G. (1977). Agric. Inf. Bull. 405. Washington, DC: US Department of Agriculture, Forest Service. 73 p., 405, 1-73.

Acknowledgments



PREAMISSE

Poster 2 :

14th International IUPAC Congress on Crop Protection, 19 au 24 mai 2019, Ghent, Belgique.

Spatio-temporal dynamics of trunk injected imidacloprid, pirymethanil and difenoconazole in apple tree

C. Berger¹, A. Renier², L. Mediouni¹, F. Laurent¹

¹Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

*²Cetev, La Pousaraque, Le Faget, France
cyndel.berger@inra.fr*

Prix du meilleur poster dans le thème « Application technology and formulation »

Aerial spraying of plant protection products (PPP) is the most common application for pest management in trees. However, sprayers have drawbacks due to extensive pesticides drift losses and are impracticable for large tree sizes and in proximity of urban areas. Due to risks of environmental contamination and adverse impacts for applicators, legislative restrictions are applied in Europe to eliminate or restrict the use of this technique, particularly in urban area or non-agricultural zone. This means that alternative approaches have to be considered and tree trunk injection seems to be a promising technology.

The concept of trunk injection is to deliver PPP directly in the vascular system to avoid root or cuticular barrier and disperse PPP inside the plant. The PPP transport and success of the injection depends on many factors such as the characteristics of the compounds, tree anatomy and physiology, timing and injection site, environmental conditions.

The objective of this study is to determine the transfer kinetics of three molecules (imidacloprid, pyrimethanil and difenoconazole) and their distribution in the tree in relation to the injection site. Two experiments were conducted in a goblet pruning apple orchard in Corbarieu (France). 12 apple trees were trunk-injected. The localization of the injection site in the trunk differs between both experiments. Injections were performed directly with a syringe, without drilling, and 1 ml of solution were delivered. Leaves were collected 7, 20, 41 and 62 days after injection and according to 6 zones, in each scaffold branches. Molecules were quantified by LC-MS/MS after QuEChERS extraction method.

Results show a huge variability of the concentrations between branch sectors and trees. Overall, imidacloprid (log K_{ow} , 0.57) is better transferred than pyrimethanil (log K_{ow} , 2.84), whereas very low concentrations are obtained with difenoconazole (log K_{ow} , 4.36). The lipophilicity of the active substances can explain the differences. Difenoconazole was strongly adsorbed in vascular tissues and it is rapidly metabolized in leaves. The homogeneity of the treatment in the canopy depends on the position of the injection site in the trunk.

Spatiotemporal dynamics of trunk injected imidacloprid, pyrimethanil and difenoconazole in apple trees



C. Berger^{1*}, A. Renier², L. Mediouni¹, F. Laurent¹
¹ Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France
² Cetev, La Pousarague, Le Faget, France.
 * cyndel.berger@inra.fr



Introduction

- Currently pest and disease management in orchards and forests is mainly performed by aerial spraying of plant protection products (PPPs)
 - Leads to extensive drift losses (Cross et al., 2001)
- Trunk injection of PPPs is a promising method to reduce the risks associated with spraying and reduce the use of pesticides (Doccoa and Wild, 2012)
- Trunk injection consists of injecting PPPs in the sapwood (xylem), using the vascular system to deliver PPPs to the canopy
- Injection of various PPPs : Agrochemicals, growth regulators, defense activators, plant bio-stimulants, fertilizers and biological control agents



- Objectives :**
- Follow the transfert of active substances with different physico-chemical characteristics in apple trees
 - Evaluate the effect of the tree anatomy according to the zone of injection
 - Assess residues in fruits



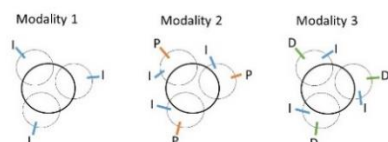
Material and methods

- Apple trees, gobelet pruned with 3 scaffold branches

- Trunk injection of 3 compounds: 1ml per injection

	K _{ow}	Concentration (mg/ml)
Imidacloprid (I)	0.57	20
Pyrimethanil (P)	2.84	10
Difenoconazole (D)	4.4	16

- Injection in scaffold branches, 3 trees per modality

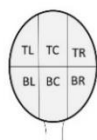


- Leaf sampling :

- 4 dates : 7, 20, 41, 62 days after injection (DAI)
- 6 zones, 20 leaves

- Apple sampling:

- Harvest time (41 DAI)
- 6 zones, 4 apples



- Residue analysis:

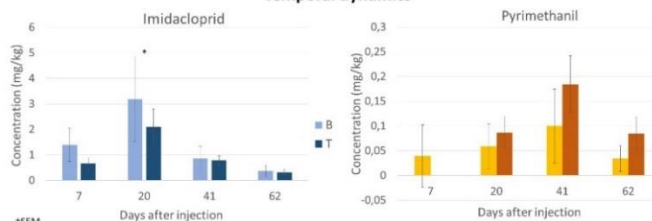
- Extraction QuEChERS
- HPLC-MS/MS



Each scaffold branch considered as an independant axe
 → 9 replicates per modality

Results

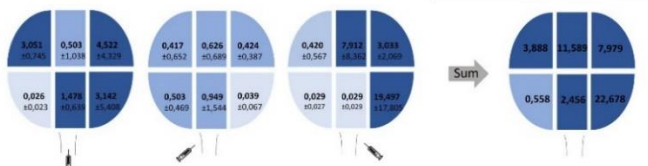
Temporal dynamics



Imidacloprid is faster transferred than pyrimethanil :
 Concentration pic : 20 DAI for imidacloprid
 41 DAI for pyrimethanil

Concentrations: Imidacloprid > Pyrimethanil > Difenoconazole
 Difenoconazole is little or not transferred at all, or rapidly metabolized in leaves

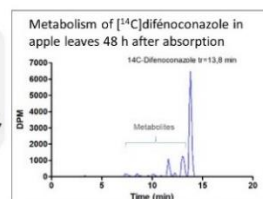
Spatial distribution of imidacloprid in leaves



Heterogeneous distribution;
 Higher concentrations reached when injected in the center or in the right side of the trunk;
 Multi-port injections lead to a better homogeneity of distribution

Residue assessment in apple fruits

Chemical risk for consumer is low: residue concentrations below LOQ, except for 1 sample below LMR



Discussion

- High variability between trees and heterogeneous distribution → High sectoriality of apple trees
- More than one injection port is needed in order to cover all the canopy. Acimovic et al. (2014) found that four injection ports are needed to obtain an uniform distribution of imidacloprid in apple trees, but with lower number of sampling zone
- Differences in the transfer between compounds can be explained by their different lipophilicity: Imidacloprid is better and faster transferred than both others because of its lower lipophilicity. Difenoconazole is strongly bound to the xylem vessels (personal data) due to its high lipophilicity and, consequently, it was weakly mobile
- Metabolism of the active substance in the leaves also affected the recovered concentrations: half-life of difenoconazole in leaves was short = 48h
- Metabolism in the leaves needs to be quantified and more work has to be done on formulation to improve the transfer of lipophilic compounds

References:

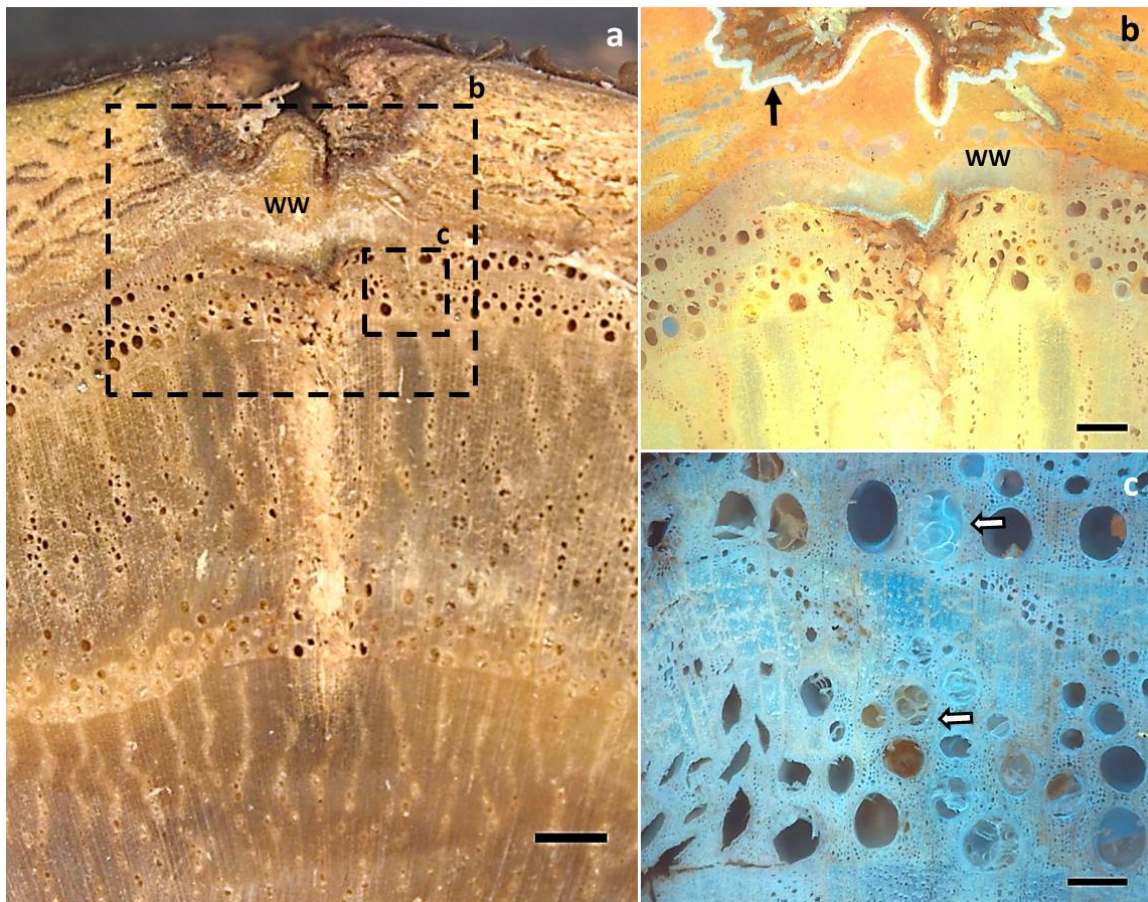
- Acimović, S. G., VanWoerkom, A. H., Reeb, P. D., Vandervoort, C., Garavaglia, T., Clegg, B. M., & Wise, J. C. (2014). Spatial and temporal distribution of trunk-injected imidacloprid in apple tree canopies. *Pest management science*, 70(11), 1751-1760.
- Cross, J. V., Walklate, P. J., Murray, R. A., & Richardson, G. M. (2001). Spray deposits and losses in different sized apple trees from an axial fan orchard sprayer: 2. Effects of spray quality. *Crop Protection*, 20(4), 333-343.
- Doccoa, J. J., & Wild, P. M. (2012). Tree injection as an alternative method of insecticide application. In *Insecticides-basic and other applications*. IntechOpen.



PREAMISSE

Annexe 3 : Blessure d'injection chez le châtaignier

Observations macroscopiques de coupes transversales de sites d'injection chez le châtaignier 5 mois après injection de difénoconazole. (a) Coupe en lumière visible montrant la structure d'une blessure d'injection. Cette image montre la présence de bois de plaie (WW) qui s'est formé. Le bois présent dans l'axe de l'injection est très peu coloré. (b) Observation en fluorescence d'un agrandissement de la zone impactée par l'injection. Une assise subéro-ligneuse (flèche noire) apparaît autour de la zone impactée dans l'écorce. (C) Zoom sur la limite de la zone impactée par l'injection. Des thylls bouchent les vaisseaux à l'interface (flèches blanches). Barre d'échelle : a = 1 mm; b = 0,5 mm ; c = 0,2 mm.



Résumé : L'injection de produits de traitement des plantes (PPP) dans le tronc des arbres est une méthode alternative aux traitements phytosanitaires par pulvérisation aérienne. Cette méthode consiste à positionner les PPP dans le système vasculaire, le flux xylémien assurant la dispersion de la molécule dans l'arbre. Les résultats d'efficacité aléatoires de ces méthodes nécessitent de mieux comprendre le transfert et la distribution des PPP dans l'arbre afin d'optimiser les traitements. Une méthode non invasive, la micro-injection à l'aide d'une aiguille de faible diamètre, a été utilisée dans ce projet, et pour laquelle il s'agissait de déterminer la résilience de la blessure d'injection occasionnée par l'aiguille. Les blessures ont été analysées par imagerie sur des coupes de troncs de pommiers et de vignes. Les observations ont révélé la mise en place de barrières physico-chimiques isolant la blessure de l'atmosphère extérieur, avec compartimentation d'une zone impactée de faible volume tissulaire et une résilience assez rapide de la blessure sur pommiers. D'autre part, la cinétique de distribution de 3 substances actives, difénoconazole, imidaclopride et pyriméthanile, a été suivie après injection chez le pommier. Les analyses par LC-MS/MS ont montré une grande variabilité dans la distribution foliaire des substances actives et des concentrations dans les fruits inférieures aux limites maximales de résidus. L'emploi de colorants ou de PPP radiomarqués a permis d'étudier les paramètres qui contrôlent la distribution. Ces essais ont montré que la sectorisation du système vasculaire et la trajectoire des faisceaux vasculaires régissent la distribution spatiale. En outre, la rétention des substances actives sur les vaisseaux de xylème est le facteur principal du faible transfert de certaines substances actives qui peut être amélioré par l'utilisation de tensio-actifs. Par ailleurs, l'efficacité de trois autres substances actives, thiabendazole, allicine, nanoparticules d'argent, a été testée *in vitro* contre différents champignons pathogènes en vue de leur utilisation par injection. Le thiabendazole, qui présentait la meilleure efficacité, et l'allicine semblent être de bons candidats pour cette utilisation. Ces travaux ont permis de montrer que la micro-injection était une méthode de traitement durable sans risque pour les arbres mais que des progrès dans les formulations devaient être encore faits pour obtenir une efficacité suffisante.

Abstract : Trunk injection of plant protection products (PPP) into trees is an alternative method to aerial spraying. This method consists in placing PPP in the vascular system, the sapflow ensuring the dispersion of the molecule in the tree. The random efficacy results of these methods require a better understanding of the transfer and distribution of PPP in the tree in order to optimize treatments. A non-invasive method, the micro-injection with a small diameter needle, was used in this project to determine the resilience of the injection wound caused by the needle. Wounds were analyzed by imaging on sections of apple tree trunks and vines. The establishment of physico-chemical barriers was observed on apple trees. The wound is then isolated from the external atmosphere by compartmentalization of a limited impacted tissue area and a quite rapid resilience of the wound. The distribution kinetics of three active ingredients (a.i) difenoconazole, imidacloprid and pyrimethanil, was monitored after injection in apple trees. Analyses by LC-MS/MS showed a high variability in the foliar distribution of a.i. and concentrations in fruits were below the maximum residue limit. Dyes or radiolabeled PPP were used to study the parameters that control the distribution. These results showed that sectorization of the vascular system and patterns of water flow govern the spatial distribution. In addition, the retention of a.i. on xylem vessels is the main factor explaining the low transfer of some a.i. which can be improved by using surfactants. Furthermore, the efficacy of three others a.i., thiabendazole, allacin and silver nanoparticles, has been tested *in vitro* against various pathogenic fungi to be used by injection. Thiabendazole, which had the highest efficacy, and allacin appeared to be good candidates for this purpose. This work showed that micro-injection was a lasting treatment method without risk for the trees. Further progress in PPP formulations are nevertheless still needed to achieve sufficient efficacy.